

**BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG VON TEMPERATUR-SENSITIV
ATMUNGSDEFIZIENTEN SACCHAROMYCES CEREVISIAE MUTANTEN:
ENTWICKLUNG NEUER METHODEN ZU IHRER BIOCHEMISCHEN
CHARAKTERISIERUNG SOWIE NACHWEIS SPEZIFISCHER
CYTOCHROM C-OXIDASE BZW.-REDUKTASE MUTATIONEN**

**Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg**

zur

Erlangung des Doktorgrades

**vorgelegt von
Wolfgang Demmer
aus Bad Kissingen**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546209_0058

**BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG VON TEMPERATUR-SENSITIV
ATMUNGSDEFIZIENTEN SACCHAROMYCES CEREVISIAE MUTANTEN:
ENTWICKLUNG NEUER METHODEN ZU IHRER BIOCHEMISCHEN
CHARAKTERISIERUNG SOWIE NACHWEIS SPEZIFISCHER
CYTOCHROM C-OXIDASE BZW.-REDUKTASE MUTATIONEN**

**Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg**

zur

Erlangung des Doktorgrades

**vorgelegt von
Wolfgang Demmer
aus Bad Kissingen**

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung:

12. 2. 1980

Vorsitzender der Promotionskommission:

Prof. Dr. H. Wegener

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. E. Schweizer

Zweitberichterstatter:

Prof. Dr. W. Zumft

Die vorliegende Dissertation wurde von September 1975 bis September 1979 im Institut für Mikrobiologie und Biochemie der Universität Erlangen-Nürnberg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Schweizer angefertigt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Für die wertvolle Mithilfe bei der Konstruktion der Apparatur zur automatischen Kontrolle der Zelldichte danke ich Herrn H. Mümmeler und Herrn Ing. W. Hagen.

Im übrigen wurde diese Arbeit selbständig ausgeführt. Andere als die angegebene Hilfsmittel und Quellen wurden nicht verwendet.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	4
Verzeichnis der Figuren	6
Verzeichnis der Tabellen	9
Abkürzungsverzeichnis	10
 I. EINLEITUNG	 11
II. MATERIAL UND METHODEN	20
1. Chemikalien	20
2. Medien	20
3. Stämme	21
4. Apparate	21
5. Proteintest	22
6. Isolierung von Cytochrom c Oxidase aus Bäckerhefe	23
7. Gelelektrophorese	23
8. Isolierung von Antikörpern gegen das Enzym Cytochrom c Oxidase	23
9. Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY	24
10. Anzucht homogener, genetisch definier- ter 30 ml Mutanten-Flüssigkulturen	24
11. Reversionstest	25
12. Differenzierung zwischen cytoplasma- tischen <u>petite</u> -Mutanten (<u>rho</u> -Typ) und nuklearen <u>pet</u> -ts-Mutanten	26
13. Isolierung von submitochondriellen Partikeln	26
14. Enzymtests	27
15. Kinetische Untersuchungen des Verlusts der Atmungsfähigkeit von <u>pet</u> -ts-Mutan- ten mit gleichzeitiger Untersuchung der mitochondriellen Enzymmuster	28
16. Aufnahme von Tieftemperaturspektren der Cytochrome der Atmungskette	30

17. Züchtung von Hefezellen unter Verwendung eines Apparates zur automatischen Konstanthaltung der Zelldichte	31
18. Automatischer Probennehmer zur selbsttätigen Messung von Atmungsraten ganzer Hefezellen	35
19. Entwicklung eines Apparates zur Erzeugung eines linearen Temperaturanstieges im Fermenter	38
III. ERGEBNISSE	40
1. Biochemische Untersuchung von <u>pet-ts</u> -Mutanten nach Anzucht bei nicht-permissiver Temperatur bis zur stationären Phase	40
2. Kinetische Untersuchungen zum Verlust der Atmungsfähigkeit und der Aktivität verschiedener mitochondrieller Enzyme in <u>pet-ts</u> -Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur	48
3. Anzucht von ausgewählten <u>pet-ts</u> -Mutanten im Chemostaten unter Verwendung eines automatischen Probennehmers und Entwicklung einer Anordnung zur automatischen Konstanthaltung der Zelldichte	100
4. Immunologische Untersuchung von Cytochrom c Oxidase-defekten <u>pet-ts</u> -Mutanten	115
IV. DISKUSSION	118
V. ZUSAMMENFASSUNG	123
VI. LITERATURVERZEICHNIS	125
Lebenslauf	

VERZEICHNIS DER FIGUREN

Fig. 1	Schema des aeroben Abbaus von Glukose, Fettsäuren und Aminosäuren	12
Fig. 2	Die mitochondrielle Atmungskette: Komponenten und ihre funktionellen Zusammenhänge	14
Fig. 3	Schematischer Aufbau eines 100ml-Chemostaten zur Bestimmung der Inaktivierungskinetik temperatur-sensitiver <u>pet</u> -Mutanten	29
Fig. 4	Schematischer Aufbau eines 1l-Chemostaten mit automatischer Zelldichte-Kontrolle	32
Fig. 5	Prinzipschaltbild des Brückenspannungsverstärkers	34
Fig. 6	Prinzipschaltbild eines automatischen Probennehmers	35
Fig. 7	Programm und Kontaktbelegung des Schrittschaltwerkes	37
Fig. 8	Schematischer Aufbau der angeschlossenen Sauerstoff-Elektrode für Chemostat-Kulturen	37
Fig. 9	Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Vorrichtung zur kontinuierlichen Erhöhung der Temperatur in Fermentern	38
Fig. 10	Gesamtansicht eines 1l-Chemostaten mit angeschlossenen automatischen Probennehmer, Sauerstoff-Elektrode, automatischer Zelldichte-Kontrolle, Vorrichtung zur kontinuierlichen Temperaturerhöhung und dazugehörigen Schreibern	39

Fig. 11	Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs einer <u>Saccharomyces cerevisiae</u> Zellsuspension von der Zelldichte	41
Fig. 12	Enzymabhängigkeit des Cytochrom c Oxidase-, NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase- und des ATPase-Tests	42
Fig. 13	ATP-Abhängigkeit sowie Oligomycin-Empfindlichkeit der ATPase	42
Fig. 14-75	Inaktivierungskinetiken von <u>pet-ts</u> -Mutanten in Chemostat-Kulturen nach sprunghafter Erhöhung der Inkubations-Temperatur von 22°C auf 36°C zum Zeitpunkt Null	54
Fig. 76-96	Tieftemperatur-Cytochrom-Spektren von <u>pet-ts</u> -Mutanten nach unterschiedlich langer Kultivation im Chemostaten bei nicht-permissiver Temperatur	87
Fig. 97	Wachstumsraten von <u>Saccharomyces cerevisiae</u> Wildtyp-Zellen in Abhängigkeit von der Temperatur	102
Fig. 98	Zelldichte-Diagramm einer <u>Saccharomyces cerevisiae</u> Wildtyp-Kultur im Verlauf einer Kultivation bei kontinuierlich ansteigender Temperatur	103
Fig. 99	Zelldichte-Diagramm einer <u>pet-ts</u> -Mutanten-Kultur (ts-203) im Verlauf einer Kultivation bei kontinuierlich ansteigender Temperatur	104
Fig. 100-103	Wachstumsraten und Sauerstoffverbrauch von Wildtyp-Zellen und <u>pet-ts</u> -Mutanten im Verlauf einer Kultivation bei kontinuierlich ansteigender Temperatur	105
Fig. 104-105	Wachstumsraten und Sauerstoffverbrauch von <u>pet-ts</u> -Mutanten nach sprunghafter Erhöhung der Temperatur von 22°C auf 36°C zum Zeitpunkt Null	109

Fig. 106	Automatisch gemessene Atmungs- raten einer <u>pet-ts</u> -Mutanten-Kultur (ts-1533) mit <u>selbsttätig</u> entnom- menen Proben zu verschiedenen Zeit- punkten vor und nach sprunghafter Erhöhung der Temperatur von 22°C auf 36°C	112
Fig. 107	Raumtemperatur-Cytochrom-Spektrum eines gereinigten Cytochrom c Oxi- dase-Präparates	114
Fig. 108	SDS-Gelelektrophorese-Muster eines gereinigten Cytochrom c Oxidase- Präparates	114

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1	Untersuchung von Atmungsrate, ATPase-, Cytochrom c Oxidase-, NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase- Aktivität und <u>rho</u> ⁻ -Gehalt von <u>pet</u> -ts-Mutanten verschiedener Komplementationsgruppen	44
Tab. 2	Immunologische Untersuchung Cytochrom c Oxidase-defekter <u>pet</u> - ts-Mutanten verschiedener Komple- mentationsgruppen	114

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adrenosintriphosphat
CRM	Kreuzreagierendes Material
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAD/FADH ₂	Oxidiertes bzw. reduziertes Flavin-adenin- dinukleotid
FMN/FMNH ₂	Oxidiertes bzw. reduziertes Flavin-mono- nukleotid
LAC	Laktat-Medium
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
M	Molar
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MIN	Minimal-Medium
ml	Milliliter
mMol	Millimol
μ Mol	Mikromol
NAD ⁺ /NADH	Oxidiertes bzw. reduziertes β -Nikotinamid- adenin-dinukleotid
OSCP	Oligomycin-Sensitivity-Confering-Protein
pet	Symbol für nukleare "petite"-Mutation
rho	Symbol für cytoplasmatische "petite"-Muta- tion
r-RNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
ts	Temperatur-Sensitiv
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
WT	Wildtyp
YEP	Hefeextrakt-Pepton-Medium

I. EINLEITUNG

Die Oxidation von geeigneten Nährstoffen durch molekularen Sauerstoff, die in der lebenden Zelle abläuft, wird als Atmung bezeichnet. Dabei wird die freiwerdende Energie in Form von chemischer Energie als Adenosintriphosphat gespeichert und anderen energiebedürftigen Prozessen der Zelle, z.B. aktiver Transport von Ionen oder Molekülen und für Syntheseleistungen (anabole Stoffwechselprozesse) zur Verfügung gestellt. Dementsprechend wird die Koppelung von Synthese energiereicher Phosphatverbindungen mit der Oxidation biologisch gebundener Reduktionsäquivalente durch Sauerstoff als oxidative Phosphorylierung bezeichnet.

Der Abbau z.B. eines Kohlenhydrates wie Glukose läuft in der Zelle in mehreren Stufen ab, die sowohl räumlich als auch funktionell voneinander getrennt sind (Fig. 1). In der ersten Stufe, der Glykolyse wird Glukose in einer Reihe von enzymatisch katalysierten Schritten in Brenztraubensäure umgewandelt. Dazu ist die Anwesenheit von Sauerstoff nicht erforderlich. Die weiteren Schritte des oxidativen Endabbaus werden in höheren Zellen und damit auch in Hefe von speziellen Zellorganellen, den Mitochondrien, durchgeführt. Nach oxidativer Dekarboxylierung der Brenztraubensäure zu Acetyl-CoA durch das Enzym Pyruvat-Dehydrogenase wird das Kohlenstoffgerüst der an Coenzym A gebundenen Essigsäure im Trikarbonsäurezyklus zu CO_2 oxidiert. Die dabei anfallenden Reduktionsäquivalente werden als NADH bzw. FADH_2 in die Atmungskette eingeschleust (vgl. Abb. 1). Ein beträchtlicher Teil der Energie, welche bei dem Transport der Elektronen von NADH bzw. FADH_2 auf molekularen Sauerstoff frei wird, wird dabei in Form von ATP konserviert (Oxidative Phosphorylierung; vgl. Abb. 1).

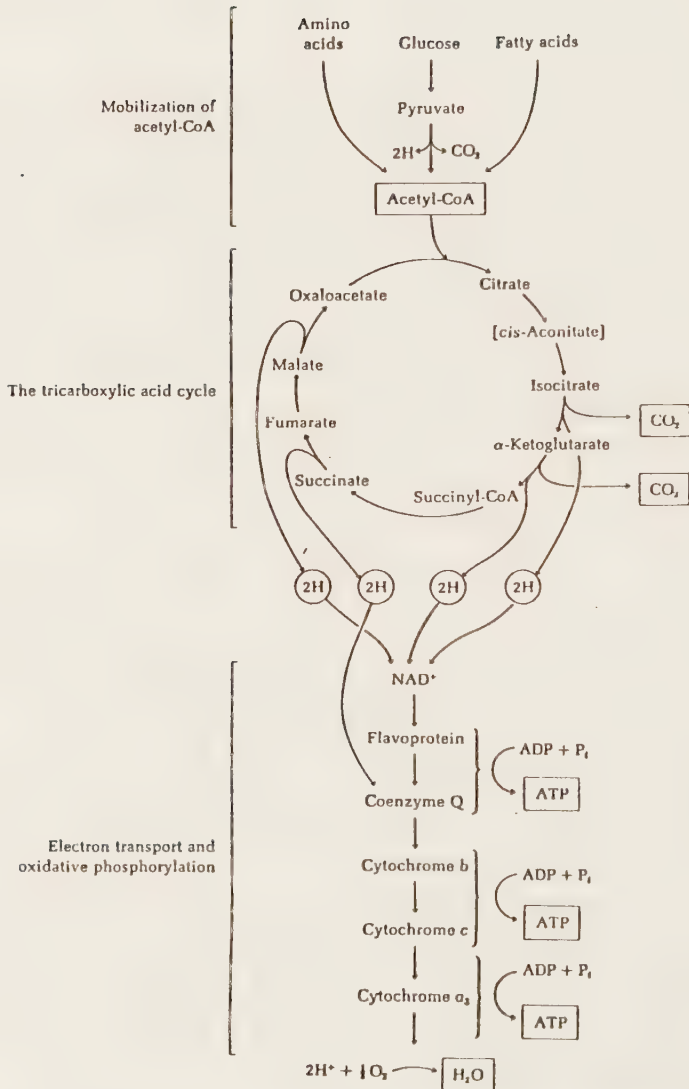


Fig. 1: Schema des aeroben Abbaus von Glukose, Fettsäuren und Aminosäuren nach LEHNINGER (1).

Die Enzyme des Trikarbonsäurezyklus, außer der Succinat-Dehydrogenase und der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, liegen in den Mitochondrienmatrix gelöst vor. Die Komponenten der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung ebenso wie die beiden oben erwähnten Enzyme sind dagegen integraler Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran. Die verschiedenen funktionellen Komponenten der inneren Mitochondrienmembran waren in den vergangenen Jahren bezüglich ihrer enzymatischen Funktion und molekularer Struktur Gegenstand intensiver Untersuchungen. Das daraus abgeleitete und heute weithin gültige Konzept für die relative Anordnung der Atmungskettenkomponenten und die verschiedenen Schritte des Elektronentransportes in der Kette ist in Fig. 2 wiedergegeben. Gleichzeitig sind die drei Stellen (bezeichnet "Site I"- "Site III") dargestellt, an denen die während des Elektronentransportes von NADH auf Sauerstoff freiwerdende Energie Anlaß für die Bildung je eines Moleküls ATP gibt (2).

Nach der von P. MITCHELL formulierten sog. "chemiosmot. Hypothese" der oxidativen Phosphorylierung ist ein Elektronentransportgetriebenes elektrochemisches Potential das Bindeglied zwischen den beiden chemischen Prozessen der Elektronenübertragung von Reduktionsäquivalenten auf molekularen Sauerstoff und der ATP-Synthese (3, 4). Nach dieser Hypothese wird durch den Elektronentransport in der inneren Mitochondrienmembran ein pH-Gradient und ein elektrochemisches Potential zwischen Innen- und Außenseite der Mitochondrienmembran aufgebaut. Beide, Protonengradient und Membranpotential, bilden zusammen die Kraft, durch welche die Protonen wieder in das Mitochondrien-Innere zurückgetrieben werden. Bei diesem Protonenrücktransport soll dann, unter Beteiligung des Enzyms ATPase, nach einem im einzelnen bisher noch unbekannten Mechanismus die Bildung von ATP stattfinden.

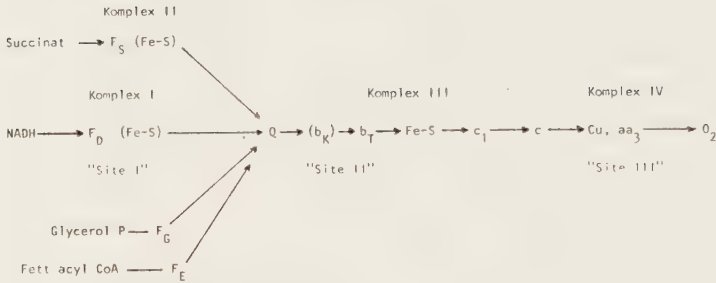


Fig. 2: Die mitochondrielle Atmungskette: Komponenten und ihre funktionellen Zusammenhänge nach METZLER (2)

Es sind die Eintrittsstellen der Elektronen von verschiedenen Substraten und die Kopplungsstellen der Energiekonservierung gezeigt. Bei den Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* fehlt die erste Kopplungsstelle. Die Symbole F_S , F_D , F_G und F_E bedeuten Flavoprotein, (Fe-S) sind Eisen-Schwefel-Zentren, Q ist Ubichinon aa_3 , c, c_1 , b_T und b_K bedeuten Cytochrome, Cu sind die Kupfer-Atome der Cytochrom c Oxidase.

Die Elektronentransportkette kann demnach in fünf multifunktionelle Komplexe zerlegt werden: (5)

1. NADH-Ubichinon-Reduktase (Komplex I; MG ca. 850 000), besteht aus mindestens 16 Protein-Untereinheiten und enthält ein nicht-kovalent gebundenes FMN sowie 5-6 FeS-Zentren mit 16-24 FeS-Gruppen (5-10).
2. Succinat-Ubichinon-Reduktase (Komplex II; MG ca. 97 000), besteht aus 2 Untereinheiten mit einem kovalent gebundenem FAD und 3 FeS-Zentren (5,11-14).
3. Ubichinon-Cytochrom c Reduktase (Komplex III; MG 280 000), besteht aus 6-8 Untereinheiten, enthält 2 b-Typ Cytochrome, ein Cytochrom c_1 und 2 FeS-Zentren (5,15-18).
4. Cytochrom c Oxidase (Komplex IV; MG 200 000), besteht aus 7 Untereinheiten, enthält 2 Cytochrome vom a-Typ und 2 Kupferatome (5,19-24).
5. Der Komplex der mitochondriellen ATPase setzt sich aus drei verschiedenen Teilen zusammen, einem in der Membran verankerten "Basisstück", einem darauf aufgesetzten und von der Membran abstehenden "Stiel" sowie einem auf diesem Stiel befestigten "Kopfstück" (5, 25-31).
 - a) F_1 , das Kopfstück enthält die katalytische ATPase-Aktivität. Es besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten, zu denen noch eine spezifische Inhibitor-Komponente kommen kann.
 - b) Das Basisstück F_0 besteht aus 3-4 Untereinheiten und hat wahrscheinlich die Funktion eines Kanals, der die Protonen durch die inneren Mitochondrienmembran transportiert.

- c) Der "Stiel" besteht aus 2 Komponenten, dem sog. "Oligomycin Sensitivity Conferring Protein" und dem Protein Fc_2 . Sie sind zur Bindung von F_1 an das Basisstück notwendig.

Während somit zur molekularen Struktur und zur topologischen Anordnung der Enzyme der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung bereits recht konkrete, experimentell belegte Vorstellungen herrschen, sind sehr viele wichtige Fragen im Zusammenhang mit der Biosynthese der betreffenden Enzymsysteme, noch ungeklärt:

1. Wie wird die Biosynthese der verschiedenen funktionellen Komponenten der oxidativen Phosphorylierung als ganzes kontrolliert?

Es ist bekannt, daß z.B. aerobe Bedingungen ihre Synthese stimulieren, während anaerobe und bestimmte katabole Stoffwechselbedingungen (Katabolit-Repression) sie hemmen (32,33). Weiterhin ist bekannt, daß der Ausfall bestimmter Membran-Komponenten - etwa durch Mutation - das Verschwinden anderer Komponenten nach sich zieht (59).

2. Wie wird eine koordinierte Synthese und der korrekte Zusammenbau der Untereinheiten von oligomeren Komponenten in die Membran gewährleistet?

Alle fünf Komplexe bestehen aus mehreren Untereinheiten (7,12,15,20,26). Es wäre denkbar, daß bestimmte Untereinheiten regulierend auf die Synthese der anderen Untereinheiten desselben Komplexes wirken.

3. Wie erfolgt der Transport der Komponenten vom Ort ihrer Bildung (Cytoplasma) ins Innere der Mitochondrienmembran?

Auch hierzu existieren im Einzelfall schon experimentelle Befunde, deren Allgemeingültigkeit noch zu beweisen ist (34).

4. Erfolgt der Einbau der Komponenten in die Membran gemäß einem definierten zeitlichen oder strukturellen Schema, und wie wird dies gewährleistet?
5. Welche Faktoren sind für die Ausprägung der biochemischen Aktivität der in die Membran integrierten Komponenten ausschlaggebend? Zu denken wäre hierbei insbesondere an Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen.

Ein allgemein gangbarer Weg, um Aufschluß über Fragen der oben genannten Art zu erhalten, ist die Isolierung von Mutanten, welche in der Funktion oder Biosynthese der betreffenden Proteine geschädigt sind. Hefemutanten mit defekter Atmungsfähigkeit sind seit langem bekannt ("petite"-Mutanten). Der Defekt läßt sich gewöhnlich auf eine spezifische Schädigung einer oder mehrerer Mitochondrien-Funktion zurückführen. Die Synthese funktionsfähiger Mitochondrien steht unter der gemeinsamen Kontrolle zweier genetischer Systeme, der Kern-DNA und der Mitochondrien-DNA. Dementsprechend unterscheidet man zwei Arten von Atmungs-defekten Mutanten, sog. "cytoplasmatische" (Mitochondrien-DNA) und sog. "vegetative" (Kern-DNA) petite-Mutanten. Schon aus der begrenzten Größe der mitochondriellen DNA (20-25 um; $5-6 \times 10^7$ Daltons in Hefe) (35) geht hervor, daß die Mehrzahl der in einem Mitochondrion enthaltenen Proteine durch Gene der Kern-DNA kodiert werden müssen. Lediglich für eine kleinere Zahl von Mitochondrien-Komponenten konnte eindeutig gezeigt werden, daß ihre Strukturgene auf der mitochondriellen DNA liegen. Dabei handelt es sich um ver-

schiedene t-RNA's (35), die 16S und 23S r-RNA (35), sowie um ca. 8 verschiedene Proteine (36). Die Charakterisierung dieser Proteine erbrachte den interessanten Befund, daß die oben erwähnten Komplexen III, IV und V sowohl Kern- wie Mitochondrien-DNA-kodierte Untereinheiten enthalten. So enthält die Cytochrom c Oxidase 3, die ATPase 4 und der Cytochrom bc_1 -Komplex eine Mitochondrien-DNA-kodierte Untereinheit (37,38,39). Offenbar sind gerade diese Untereinheiten auf Grund ihrer besonders ausgeprägten hydrophoben Eigenschaften maßgeblich an der Membran-Verankerung dieser Komplexe beteiligt.

Im Gegensatz zu der genetisch relativ gut charakterisierten Mitochondrien-DNA ist die biochemische Genetik Kern-kodierter Mitochondrien-Komponenten bisher noch nicht weit fortgeschritten. Lediglich für die Enzyme Iso-1- und Iso-2-Cytochrom c, für die Aconitase, die Aminolävulinsäure-Synthese sowie für einige andere Schritte der Porphyrin-Synthese wurden die entsprechenden spezifischen Kerngen-Mutationen charakterisiert (40,41,42,43).

Es ist eine lange bekannte Eigenschaft der Mitochondrien-DNA, daß sie sowohl spontan wie auch - mit erhöhter Häufigkeit - unter der Wirkung bestimmter Stoffwechselbedingungen, oder Mutagene, oder auch als Folge bestimmter mitochondrieller Kerngene in den Atmungs-defekten Zustand einer "cytoplasmatischen" petite-Mutanten übergehen kann. Da cytoplasmatische petite-Mutanten auf Grund ihrer ausgeprägt pleiotropen (=vielfältigen) biochemischen Defekte für die Charakterisierung von Strukturgenen und ihrer Genprodukte unbrauchbar sind, empfiehlt es sich, die biochemische Genetik der Mitochondrien-Biosynthese mit Hilfe von Temperatur-sensitiven Kern-Mutationen vorzunehmen. Mit ihnen

sollte der Übergang vom aktiven in den inaktiven Zustand unter nicht-permissiven Bedingungen kontrollierbar und somit experimentell besser verfolgbar sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Temperatur-sensitive kern-kodierte petite-Mutanten, welche in einer vorhergehenden Untersuchung (44) ca. 100 verschiedenen Komplementationsgruppen zugeordnet worden waren, hinsichtlich einer Reihe verschiedener spezifisch mitochondrieller Parameter zu charakterisieren. Dabei sollte einmal der primäre biochemische Defekt der einzelnen Mutanten festgestellt und zum anderen Antworten auf die eine oder andere der eingangs erwähnten Fragestellungen zur Biosynthese der inneren Mitochondrienmembran gefunden werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Die folgenden Substanzen wurden gekauft: Hefeextrakt, Pepton, Milchsäure (etwa 90 % reinst), EDTA (Titriplex III), K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$, K-Hexacyanoferrat II, Photorex, $NaHSO_3$, Ammoniummolybdat, Trichloressigsäure, Ammonperoxodisulfat, Tetra-
borat, Na-Salz, KCl, Glycerin wasserfrei reinst, Tween 80. Merck, Darmstadt; Sorbit, Tris, Cytochrom c, Na-Dodecylsulfat, Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED, Rinderserumalbumin, SERVA, Heidelberg; Agarose, Yeast Nitrogen Base, Difco, USA;

2. Medien

a) Hefeextrakt-Pepton-Medium (YEP):

Flüssigmedium: 0,3% Saccharose, 0,6% Pepton,
0,4% Hefeextrakt, 0,5% K_2HPO_4 ,
0,5% KH_2PO_4 .

Feste Nährböden: 1% Saccharose, 0,6% Pepton,
0,4% Hefeextrakt, 0,5% K_2HPO_4 ,
0,5% KH_2PO_4 , 2% Agar.

b) Milchsäureagar (LAC): 3% K-Laktat, pH 5.5, 0,6% Pepton, 0,4% Hefeextrakt, 2% Agar.

c) Minimalmedium (MIN): 0,3% Saccharose, 0,6% Yeast Nitrogen Base.
Wenn nötig, wurde das MIN-Medium mit Histidin (100 mg/l) supplementiert.

3. Stämme

Die haploiden Hefestämme X 218o-1A (a-Paarungstyp, Wildtyp) und X 218o-1B (α-Paarungstyp, Wildtyp) wurden ursprünglich von Dr. R. K. Mortimer erhalten. Die daraus abgeleiteten temperatursensitiv atungsdefizienten Saccharomyces cerivisiae Mutanten wurden im hiesigen Institut isoliert. Die Komplementationanalyse aller zu untersuchenden pet-ts-Stämme wurde an anderer Stelle beschrieben (44).

Die zur Isolierung des Enzyms Cytochrom c Oxidase verwendete kommerzielle Bäckerhefe wurde dankenswerterweise von der Firma BAST, Buch bei Nürnberg, zur Verfügung gestellt.

4. Apparate:

Die Nährmedien wurden in einem Webeco Typ A5 Autoklaven der Firma WEBECKE, Bad Schwartau, sterilisiert. Vorkulturen wurden je nach Größe des Inokulums auf einem Tissue Culture Rollerdrum TC7, in einem Gyrotory Water Bath Shaker Model G 75, oder in einem Controlled Environment Incubator Shaker Model G 25 (alle New Brunswick Inc. USA) angezüchtet.

Hefezellen wurden vom Kulturmedium durch Sedimentation in einer Beckman Zentrifuge Modell 21 B oder in einer Haeraeus Christ Labofuge II abgetrennt.

Der mechanische Aufschluß von Hefezellen erfolgte durch Schütteln mit Glasperlen in einem BRAUN Zellhomogenisator Typ MSK, wobei im wesentlichen die von A. TZAGOLOFF angegebenen Methode verwendet wurde (45): In einem passenden Halter wurden 16 Dur-

hamröhrchen der Firma WALDECK, Roxel, 40 x 8 mm Nr. 366558500 mit Glasperlen der Größe 0.17-0.18 mm Ø der Firma B. BRAUN, Melsungen, halbgefüllt, eingesetzt. Die weitere Verarbeitung der Proben folgte der angegebenen Methode (45).

Optische Messungen wurden in einem Gilford Spectrophotometer Model 250 mit angeschlossenem W+W Schreiber Gilford-Recorder 1100 durchgeführt. Zur Thermostatisierung der Küvette diente ein Julabo Thermostat Typ Exatherm U 3.

Tieftemperaturspektren wurden in einem AMINCO DW2 UV/VIS Spektrophotometer der AMERICAN INSTR. CO. INC. SILVER SPRING MARYLAND, ausgerüstet mit einem Tieftemperaturzusatz, durchgeführt.

Zur polarographischen Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs ganzer Hefezellen, diente eine Sauerstoffelektrode der Firma RANK BROTHERS BOTTISHAM CAMBRIDGE U. K. mit angeschlossenem SERVOGOR Kompensationsschreiber Typ RE 211. Die Küvette wurde durch einen HAAKE Umwälzthermostat Typ FJ thermostatiert.

Zelldichten wurden in einer THOMA Zellkammer oder turbidimetrisch in einem KLETT SUMMERSON Colorimeter mit Blaufilter Nr. 42 bestimmt.

5. Proteintest:

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von LOWRY (46).

6. Isolierung von Cytochrom c Oxidase aus Bäckerhefe:

Die Enzymanreicherung folgte im Wesentlichen der Vorschrift von SCHATZ (47). Dabei wurden die folgenden Veränderungen vorgenommen:

1. Es wurden von 3 kg kommerzieller Bäckerhefe ausgegangen.
2. Zur Isolierung der Mitochondrien wurde ein selbstgebautes Kühlsystem für den MANTON-GAULIN Homogenisator und eine Durchlaufzentrifuge Typ LE der Firma CARL PADBERG Lahr Baden verwendet.
3. Die isolierten Mitochondrien wurden nicht eingefroren, sondern sofort weiterverarbeitet.

7. Gelelektrophorese:

Es wurde das von LAEMMLI (48) angegebene System mit den Veränderungen von SCHATZ (47) verwendet.

8. Isolierung von Antikörpern gegen das Enzym Cytochrom c Oxidase:

Sofort nach der Chromatographie des Enzyms an DEAE-Zellulose wurde einem mittelgroßen Kaninchen 1 mg Enzyms in 1 ml 300 mM NaPO_4 Puffer pH 7.0, 1% Tween 80 emulgiert mit 1 ml Freund's Adjuvans Komplett (DIFCO) intramuskulär injiziert. Nach Ablauf von 30, 60 und 75 Tagen wurde jeweils dieselbe Menge intravenös verabreicht. Nach weiteren 15 Tagen wurde durch Carotisschnitt das Blut und daraus durch 10 min. Zen-

trifugation das Serum gewonnen, welches bei minus 70°C portionsweise eingefroren wurde.

9. Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (49):

1. Herstellung der Agarose Gelplatten.

0.35 g Agarose werden in 50 ml 0.85% Na Cl in 0.1 M Na-Borat Puffer pH 8.4 mit 0.08% Na N₃ bei 80-90°C gelöst. Je 5 ml wurden auf eine quadratische Glasplatte (5x5cm) aufgetragen.

2. Herstellung des Lochmusters.

Nach dem Erstarren wurden mit einem Korkbohrer das benötigte Lochmuster ausgestanzt (Zentralloch 5 mm, 6 Peripherlöcher mit 4 mm Ø, Abstand 5 mm) und mit einer Pasteurpipette leergesaugt.

10. Anzucht homogener, genetisch definierter 30 ml Mutanten-Flüssigkulturen:

Von jedem anzuzüchtenden Hefestamm wurde zunächst ein genetisch reiner Klon isoliert. Dazu wurden ausplattierte Zellen (ca. 100 Zellen/Platte) des betreffenden Stammes bei Raumtemperatur auf YEP-Agar bei 23°C inkubiert. Innerhalb 3-5 Tagen wuchsen die ausplattierten Zellen zu sichtbaren Klonen aus. Der petite-Mutantencharakter der ausgewachsenen Kolonien wurde durch Überstempeln der YEP-Platte auf eine bei 36°C vorgewärmte LAC-Platte und eine bei Raumtemperatur (23°C) gehaltene LAC-Platte überprüft. Diese Platten wurden 4-5 Tage bei 36°C bzw. bei 23°C inkubiert. Pet-ts-

Mutanten wachsen nur bei 23°C, nicht jedoch bei 36°C auf LAC-Agar aus.

Ein einzelner Klon des gewünschten, überprüften Genotyps wurde dann auf einer YEP-Platte ausgestrichen und bei Raumtemperatur 2-3 Tage inkubiert. Von einem solchen, gut gewachsenen Ausstrich konnten dann, mit einem sterilen Zahnstocher, zwei 30ml YEP-Flüssigkulturen beimpft werden (Zelldichte ca. 1×10^5 Zellen/ml), von denen die eine unter kräftigem Schütteln bei 36°C, die andere bei 23°C bis zur stationären Phase (40-55 h) angezüchtet wurde. Wildtyp-Kulturen erreichten dabei eine Zelldichte von $1.6 - 2.5 \times 10^8$ Zellen/ml, petite-Mutanten dagegen nur eine solche von $0.2 - 1.6 \times 10^8$ Zellen/ml.

11. Reversionstest:

Vor dem Abernten wurde jede Mutantenkultur auf ihren Gehalt an Revertanten überprüft. Dazu wurden 2 ml Zellsuspension entnommen und nach entsprechender Verdünnung auf YEP und LAC-Platten ausgestrichen. Nach 24 stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die YEP-Platte auf eine 36°C- und eine 23°C-LAC-Agar-Platte überstempelt. Nach 5-7 Tagen Inkubation bei 36°C bzw. 23°C wurden beide Abdrücke auf ausgewachsene Kolonien hin untersucht. Revertanten wachsen auf beiden LAC-Agar-Platten, Mutanten-Kolonien sollten jedoch nur auf der 23°C -Platte auswachsen.

12. Differenzierung zwischen cytoplasmatischen petite-Mutanten (rho-Typ) und nuklearen pet-ts-Mutanten:

Mitochondrien-DNA-kodierte, sog. "cytoplasmatische" petite-Mutanten können von den in dieser Arbeit untersuchten temperatursensitiven nuklearen, sog. "vegetativen" petite-Mutanten leicht dadurch unterschieden werden, daß sie auch bei permissiver Temperatur nicht auf LAC-Agar wachsen. Da, abhängig von dem untersuchten Stamm, solche cytoplasmatischen petite-Mutanten mit wechselnder und gelegentlich großer spontaner Häufigkeit auftraten, wurde eine Differenzierung zwischen "cytoplasmatischen" und "vegetativen" petite-Mutanten stets routinemäßig durchgeführt. Dazu wurden 50-100 Zellen aus den 23°C- bzw. 36°C-Flüssig-Kulturen auf 23°C YEP-Agar ausplattiert und von da, nach 2-3 Tagen Anzucht bei 23°C, auf 23°C-LAC-Agar gestempelt. "Vegetative" petite-Klone wuchsen auf LAC-Agar bei 23°C, während "cytoplasmatische" petite-Klone bereits bei dieser Temperatur nicht mehr auf LAC-Agar wuchsen.

13. Isolierung von submitochondriellen Partikeln:

Geerntete Zellen wurden mit einem Puffer (0.25 M Sorbit, 0.05 M Tris-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7.5; = Tris-Puffer) einmal gewaschen und nach der von TZAGOLOFF beschriebenen Methode (45) aufgeschlossen. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer und ganzen Zellen, 10 min bei 1100 g wurde die submitochondrielle Partikel-Fraktion 30 min bei 7200 g sedimentiert und danach noch einmal mit Tris-Puffer gewaschen. Für die nachfolgenden Enzymtests wurde dieser Niederschlag in Tris-Puffer aufgenommen (ca. 3 mg/ml).

14. Enzymtests:

1. **Cytochrom c Oxidase:** in einem Volumen von 0.2 ml 0.05 M Na-Phosphat Puffer pH 7.5, 2 mM EDTA wurden 0.16 mg mit Ascorbinsäure reduziertes Cytochrom c mit 5-20 µg mitochondriellem Protein inkubiert und die Abnahme der Extinktion bei 550 nm in einem Gilford-Spektralphotometer gemessen. Reduziertes Cytochrom c wurde durch Zugabe von 5 mg fester Ascorbinsäure zu 5 ml einer Lösung von oxidierten käuflichen Cytochrom c (8 mg/ml) hergestellt und der Überschuß Ascorbinsäure durch 10 min Schütteln an der Luft entfernt. Gelegentlich wurde die Cytochrom c-Lösung auch mit einer 5%igen Ascorbinsäure-Lösung bis zum deutlich sichtbaren Farbumschlag (dunkelrot nach hellrosa) titriert.

2. **NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase**

In einem Volumen von 0.2 ml 0.05 M Na-Phosphat pH 7.5/2 mM EDTA, der 2×10^{-4} M KCN enthielt wurden 7 nMole NADH und 0.16 mg oxidiertes Cytochrom c mit 2-10 µg submitochondriellen Partikeln inkubiert. Die Geschwindigkeit der Extinktions-Zunahme bei 550 nm wurde im Gilford-Spektralphotometer gemessen.

3. **Mitochondrielle ATPase**

0.5 ml 50 mM Tris-H₂SO₄ Puffer pH 8.5, 4 mM MgSO₄, 10 mM ATP werden mit 10-20 µg Mitochondrien-Protein bei 36°C 10 min inkubiert. Danach wurde mit 0.1 ml 50 % Trichloressigsäure die Reaktion beendet und das freigesetzte anorganische Phosphat colorimetrisch als Phosphomolybdat-Komplex bestimmt (50).

Die Enzymaktivitäten der Cytochrom c Oxidase und NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase wurden als Ratenkonstante der 1. Ordnung ausgedrückt. Als Einheit wurde E/mg/min angegeben.

15. Kinetische Untersuchungen des Verlustes der Atmungs-
fähigkeit von pet-ts-Mutanten mit gleichzeitiger Un-
tersuchung der Veränderung der mitochondriellen En-
zymmuster:

1. Beschreibung der Versuchsanordnung (vgl. Fig. 3).
In einen 300 ml Weithals Erlenmeyerkolben wird ein Gummistopfen, der von 3 Edelstahlkanülen verschiedener Länge durchbohrt ist, eingesetzt. Die längste Kanüle versorgt das MIN-Medium, welches durch einen Magneten gerührt wird, mit Druckluft. Die Temperierung erfolgte in einem flachen Wasserbad (z.B. ROWI Fotoschale 30 x 40 cm) durch einen Einhängethermostaten (Thermomix 1440 der Firma B BRAUN Melsungen). Durch die kürzeste Kanüle wird der Kultur frische MIN-Medium durch eine Förderpumpe (Typ FE 211 der Firma B. BRAUN Melsungen) zugepumpt. Diese Pumpe wird durch einen selbstschwingenden monostabilen Multivibrator (regelbare Intervallschaltung) so angesteuert, daß der Durchsatz eines Fermentervolumens (100 ml) gerade einer Generationszeit entspricht. (Schaltzeit 1 sec., Pausenzeit regelbar 2-70 sec.).

Durch die mittlere Kanüle, die in der Höhe verstellbar ist, wird das überschüssige MIN-Medium durch den herrschenden Überdruck laufend entfernt und somit das Fermentervolumen konstant gehalten.

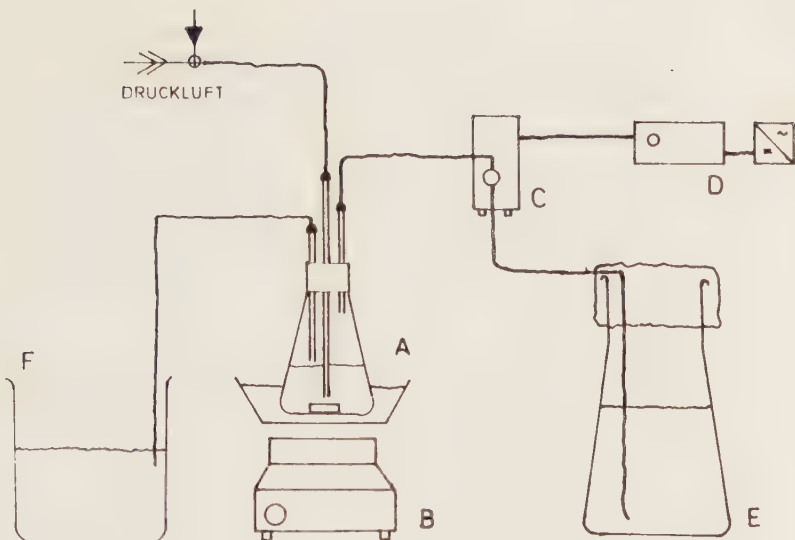


Fig. 3: Schematischer Aufbau eines 100ml-Chemostaten zur Bestimmung der Inaktivierungskinetik temperatur-sensitiver pet-Mutanten

Es bedeuten A 300ml Weithals-Erlenmeyerkolben, B Magnetrührer, C Nährmittelpumpe, D regelbare Intervallschaltung, E Vorratsgefäß und F Gefäß für überschüssiges Kultur-Medium.

2. Versuchsdurchführung

Jeweils 6 so bestückte 300 ml Erlenmeyerkolben wurden mit 50 ml MIN-Medium beschickt, mit einem frisch klonierten Inokulum (s.o.) beimpft und bei 22°C inkubiert. Nach Erreichen einer Zelldichte von 0.5×10^8 Zellen/ml wurden die Pumpen im weiteren Verlauf des Versuchs stets so justiert, daß diese Zelldichte beibehalten wurde.

Weiterhin wurde alsbald nach Erreichung der genannten Zelldichte die Inkubations-Temperatur auf 36°C erhöht. Eine erste Probe wurden den Kulturen gewöhnlich 5 Std. nach der Temperatur-Erhöhung entnommen und der zeitliche Verlauf der Enzym-Inaktivierung durch weitere Probenahmen zu den in der jeweiligen Figuren angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Jede Probenahme bestand in der gleichzeitigen Entnahme von 2 ml Kulturflüssigkeit zur Messung des O_2 -Verbrauchs, der Zellzahl und zur Bestimmung des Anteils cytoplasmatischer rho^- -Zellen, von 5 ml Zellsuspension zur Durchführung der Enzymtests und von 20 ml Suspension zur Aufnahme der Cytochrom-Tieftemperaturspektren. Die Zellen der 5 ml Probe wurden abzentrifugiert und falls sie nicht sofort verarbeitet werden konnten, bei -16°C eingefroren aufbewahrt. in allen Meßreihen wurde der erste Meßwert gleich 100 % Aktivität gesetzt.

16. Aufnahme von Tieftemperaturspektren der Cytochrome der Atmungskette:

Es wurden den in Absatz 15 beschriebenen Chemostat-Kultur während des Versuchsablaufs zu den jeweils neben den Spektren angegebenen Zeitpunkten (in Std.) 20 ml Kultursuspension mit einer Zelldichte von 5×10^7 Zellen/ml entnommen und folgendermaßen weiterverarbeitet: Die Proben wurden abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren. Waren alle Proben einer Meßreihe gesammelt, wurden sie aufgetaut und in je 1 ml Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml Glycerin zu jeder Probe wurden diese geteilt und mit Na-Dithionit und K-hexacyanoferrat II reduziert bzw. oxidiert. Nach Frieren in flüssigem Stickstoff (51) wurde das

Differenzspektrum im Wellenlängenbereich von 520-630 nm bei einer Empfindlichkeit von $E=0.1$ aufgenommen.

17. Züchtung von Hefezellen unter Verwendung eines Apparates zur automatischen Konstanthaltung der Zelldichte:

1. Beschreibung der Versuchsanordnung (Fig. 4):

Es wurde ein BIOSTAT V System der Firma B. BRAUN Melsungen mit einem 2 l Kulturgefäß verwendet. Durch die Umwälzpumpe B wird das Medium durch die Meßzelle C und von dort zurück in den Fermenter gepumpt. Diese besteht aus einer Küvette (Typ 103 der Firma HELIMA Müllheim Baden) mit Glühlampe und gegenüberliegender Fotozelle. Nimmt die Zelldichte und damit die Trübung des Nährmediums so stark zu, daß ein einstellbarer, gegebener Wert überschritten wird, so wird die als Brückenspannungsverstärker ausgelegte elektronische Regelungseinrichtung aktiviert, die die Zelldichte und damit die Trübung des Nährmediums durch Zupumpen von MIN-Medium durch Pumpe E so lange verdünnt, bis der eingestellte Wert wieder erreicht ist.

Die Zunahme der Trübung kann auf einem angeschlossenen SERVOGOR Schreiber (RE 211 der Firma METRAWATT) sichtbar gemacht werden und aus der Steigung der Geraden die Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur und somit die Generationszeit bestimmt werden.

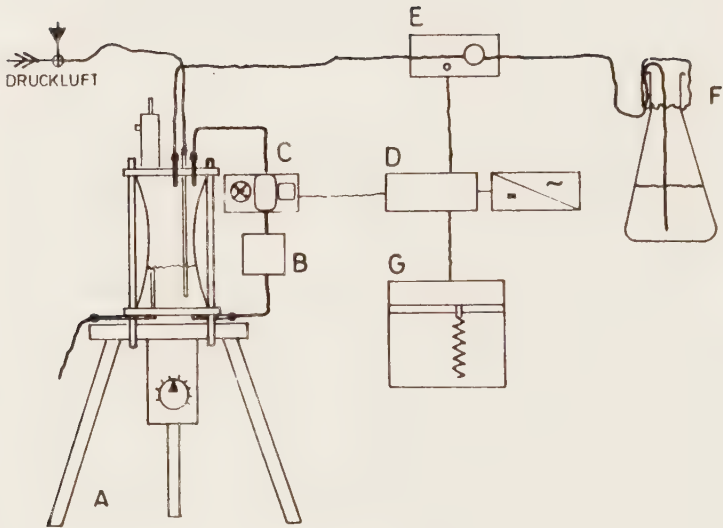


Fig. 4: Schematischer Aufbau eines 1l-Chemostaten mit automatischer Zelldichte-Kontrolle

Dabei bedeuten A Fermenter-System BIOSTAT V, B Umwälzpumpe, C Meßzelle, D Brückenspannungsverstärker mit Netzteil, E Nährmittelpumpe, F Vorratsgefäß und G Schreiber. Experimentelle Einzelheiten s. Text.

2. Beschreibung des Brückenspannungsverstärkers (Fig. 5):

Die durch die Meßzelle fließende Hefesuspension erzeugt im Strahlengang zwischen Glühlampe und Photozelle eine der Zelldichte proportionale Trübung und damit im Photowiderstand einen dazu proportionalen Strom. Die abgefallene Spannung wird anschließend im Istwert/Sollwert Vergleicher (A) mit dem vorgegebenen Wert des Sollwertgebers verglichen. Überschreitet die Spannungsdifferenz einen gewissen vorgegebenen Betrag, so wird der Schaltverstärker für die Nährmittelpumpensteuerung (B) aktiviert und über diese Pumpe dem Fermenter solange MIN-Medium zugepumpt bis die Spannungsdifferenz den eingestellten Wert wieder unterschritten hat. Im Ausgangsverstärker (C) wird die Spannungsdifferenz in ein analoges Spannungssignal umgewandelt, das auf einem angeschlossenen Kompensationsschreiber aufgezeichnet werden kann. Aus dem zeitlichen Verlauf des Spannungsanstieges kann die Wachstumsgeschwindigkeit und damit die Generationszeit der Hefekultur ermittelt werden. Sie wurde in relativer Einheiten $\Delta E/h$ angegeben. Zum Betrieb der Glühlampe wurde eine Konstantstromquelle verwendet. Zur Spannungsversorgung der Gesamtschaltung fand ein engtoleriertes stabilisiertes Netzteil (G) Verwendung, um Netzspannungsschwankungen auszuschließen.

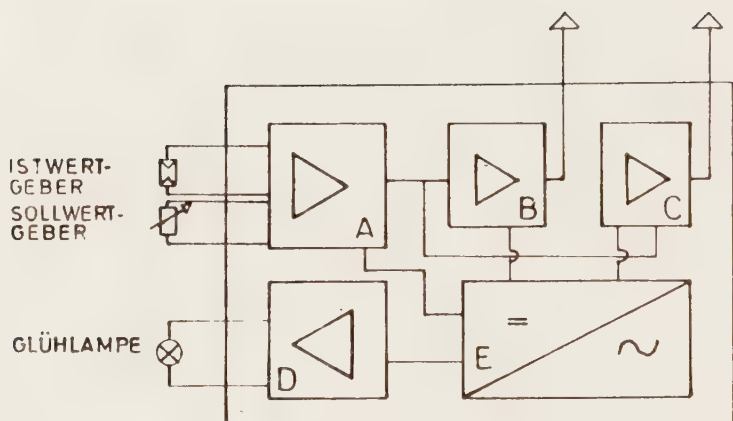


Fig. 5: Prinzipschaltbild des Brückenspannungsverstärkers

Aufbau und Wirkungsweise s. Text.

3. Versuchsdurchführung

Nach Vorbereitung eines Inokulums der zu untersuchenden Mutante wie im Abschnitt 10 (s.o.) beschrieben, wird es zusammen mit 1 l MIN-Medium in den Fermenter überführt. Die Temperatur wird durch einen Umwälzthermostaten (Typ FJ der Firma HAAKE) kontrolliert und die Rührgeschwindigkeit auf Stufe 3, die Belüftung auf 10 Nl/min eingestellt. Nach Erreichen der eingestellten Zelldichte wird die Temperatur von 22°C auf 36°C erhöht. Die Probenentnahme und die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte wie unter Punkt 15 beschrieben.

18. Automatischer Probennehmer zur selbsttätigen Messung von Atmungsraten von ganzen Hefezellen (Fig. 6).

Ein altes Schrittschaltwerk der Deutschen Bundespost wurde so umgebaut, daß vier Schaltebenen gleichzeitig kontaktiert werden konnten. Die Beschreibung der einzelnen Schrittkontakte geht aus dem Programm hervor. Schrittlänge und Schaltgeschwindigkeit ließen sich durch einen selbstschwingenden monostabilen Multivibrator (Intervallschaltung) regeln. Der Beginn des Programms wurde durch eine Schaltuhr (DIEHL Multimat) bestimmt. Das Programmende wurde durch eine Relais-schaltung erreicht.

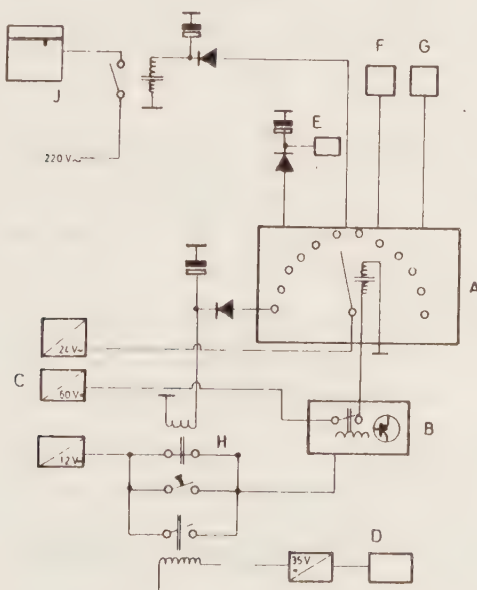


Fig. 6: Principalschaltbild eines automatischen Probennehmers

Es bedeuten A Schrittschaltwerk, B regelbare Intervallschaltung, C Netzteile, D Schaltuhr, E Magnetventil, F, G, Pumpen, H Abschaltrelais und I Schreiber. Experimentelle Einzelheiten s. Text.

Ist der Schleifer des Schrittschaltwerkes beim letzten Kontakt Nr. 12 angekommen, so wird das Abschaltrelais aktiviert, welches die Stromversorgung der Intervallschaltung unterbricht und somit den Programmablauf beendet.

Programm (Fig. 7-8)

In den verschiedenen Programmschritten wurden je nach Bedarf die Pumpen F und G, ein Magnetventil E und der an die Sauerstoffelektrode angeschlossene Schreiber aktiviert.

Schritt 1: Beide Pumpen aktiviert, die Küvette wird mit Wasser gespült.

Schritt 2: Die Küvette wird leer gepumpt.

Schritt 3: Das Magnetventil ist geöffnet. Aus dem Fermenter wird Suspension in die Küvette gepumpt.

Schritt 4: Es wird ständig Suspension durch die Küvette gepumpt, um eine Sauerstoffzehrung zu vermeiden.

Schritt 5-8: Der Schreiber ist aktiviert. Messung des O_2 -Verbrauchs der Hefekultur.

Schritt 9: Küvette wird leergepumpt.

Schritt 10: Küvette wird mit Wasser gespült.

Schritt 11: Küvette wird mit Wasser gespült.

Schritt 12: Das Programm schaltet ab.

PROGRAMM

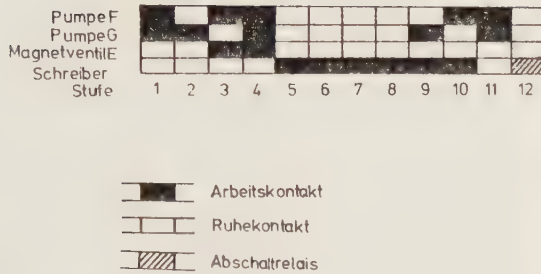


Fig. 7: Programm und Kontaktbelegung des Schrittschaltwerkes

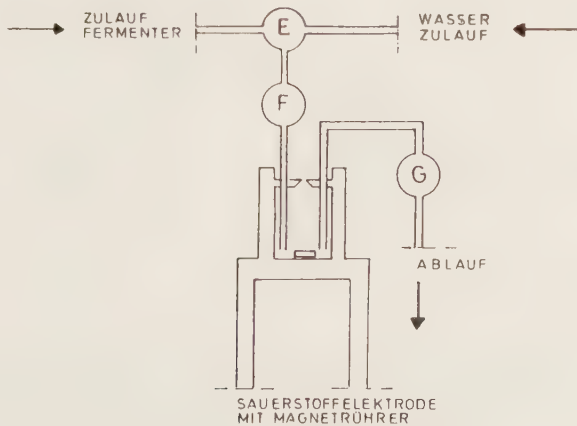


Fig. 8: Schematischer Aufbau der angeschlossenen Sauerstoff-Elektrode für Chemostat-Kulturen

Es bedeuten E Magnetventil, F und G Pumpen.

19. Entwicklung einer Apparatur zur Erzeugung eines linearen Temperaturanstieges im Fermenter (Fig. 9).

Auf das Quecksilbereinstellthermometer eines HAAKE Thermostaten FJ wird eine passend geschnittene Korkscheibe gesteckt, darauf zwei miteinander verbundenen Petrischalen befestigt. Ein breites Modellbau-Gummiband verbindet die Petrischalen mit dem Stift in einem Gummistopfen der in einer ISMATEC peristaltischen Pumpe (Typ AMY 81 der Firma SAIA AG Schweiz) steckt. Die Pumpe wird mit einem selbstschwingenden monostabilen Multivibrator über ein Relais so angesteuert, daß sich eine Drehung der großen Scheibe in 90 Minuten und damit eine Erhöhung der Temperatur um 1°C pro 3 Stunden im Thermostaten und damit im angeschlossenen Fermenter ergibt.

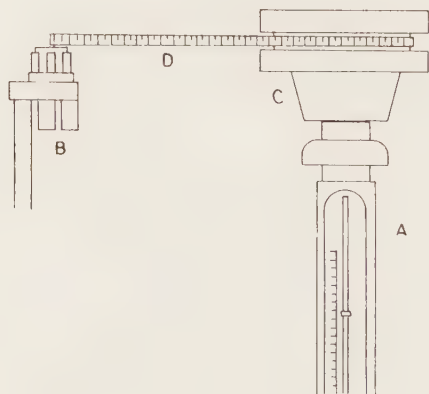
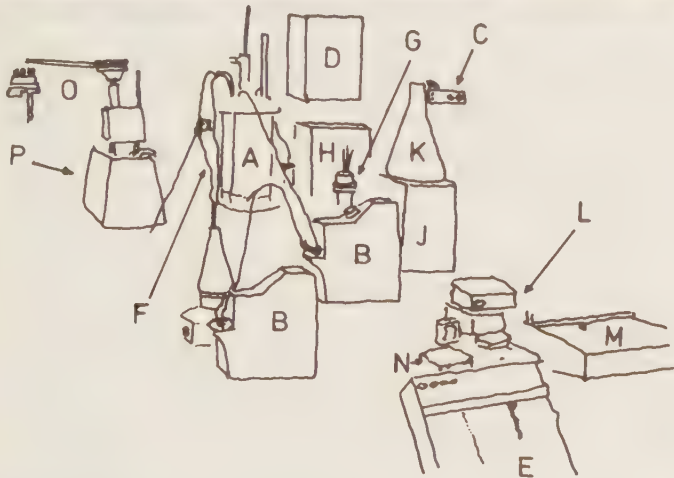
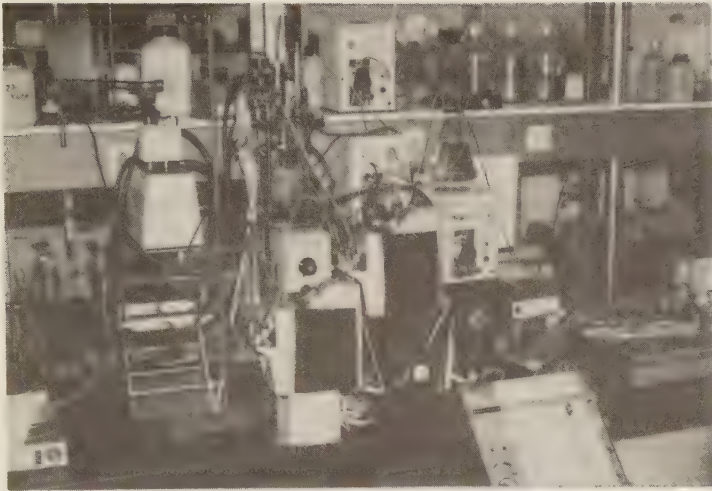


Fig. 9: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Vorrichtung zur kontinuierlichen Erhöhung der Temperatur in Fermentern

Es bedeuten A Quecksilbereinstellthermometer, B ISMATEC-Pumpe, C Petrischalen und D Gummiband. Experimentelle Einzelheiten s. Text.



10: Gesamtansicht eines 1l-Chemostaten mit angeschlossenem automatischen Probennehmer, Sauerstoff-Elektrode, automatischer Zelldichte-Kontrolle, Vorrichtung zur kontinuierlichen Temperaturerhöhung und dazugehörigen Schreibern

Es bedeuten A Fermenter-System-BIOSTAT V, B Umwälz- und Schaumabscheidepumpen, C Brückenspannungsverstärker, D Nährmittelpumpe, E Zelldichteschreiber, F Meßzelle, G Sauerstoffelektrode, H und I dazugehörige Pumpen, K Waschwasser für die Elektrode, L automatischer Probennehmer, M dazugehöriger Schreiber, N Schrittschaltwerk, O Vorrichtung zur Erhöhung der Temperatur im Fermenter und P Thermostat des Fermenters.

III. E R G E B N I S S E

1. Biochemische Untersuchung von pet-ts-Mutanten nach Anzucht bei nicht-permissiver Temperatur bis zur stationären Phase.

Vor Beginn dieser Arbeit waren die uns zur Verfügung stehenden pet-ts-Mutanten durch genetische Komplementationanalyse (cis-trans-Test) ca. 100 verschiedenen Komplementationsgruppen zugeordnet worden (44). Es sollten nun in einer ersten Versuchsserie verschiedene charakteristische, biochemische Parameter der inneren Mitochondrienmembran, wie die Atmungskettenenzyme Cytochrom c Oxidase, NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase und die Partikel-gebundene ATPase in möglichst vielen dieser Mutanten nach deren Anzucht bei nicht-permissiver Temperatur (36°C) untersucht werden. Solche Untersuchungen sollten einen ersten Hinweis auf den biochemischen Defekt liefern, der zum Verlust der Fähigkeit dieser Mutanten, Laktat zu veratmen, führte. Gleichzeitig wurde die Cyanid-sensitive Atmung der Kulturen und ihr Gehalt an rho⁻-Zellen untersucht. Fig. 11-13 veranschaulichen zunächst die Verlässlichkeit der angewandten experimentellen Methoden. Fig. 11 zeigen den O_2 -Verbrauch von Saccharomyces-cerevisiae-Wildtyp Zellen als lineare Funktion der Zellzahl und die Hemmbarkeit dieser Atmung durch Cyanid. Fig. 12 zeigen die Abhängigkeit der gemessenen Enzymaktivitäten von Cytochrom c Oxidase, NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase und ATPase unter den hier benutzten Versuchsbedingungen von der eingesetzten Menge submitochondrieller Partikel. Fig. 13 verdeutlichen die ATP-Abhängigkeit der ATPase, sowie das Ausmaß ihrer Hemmbarkeit durch Oligomycin. Der Anteil Oligomycin-resistenter Aktivität

gibt vermutlich den Gehalt der benutzten Enzym-Präparation an OSCP-freiem F_1 (vgl. Einleitung) wieder.

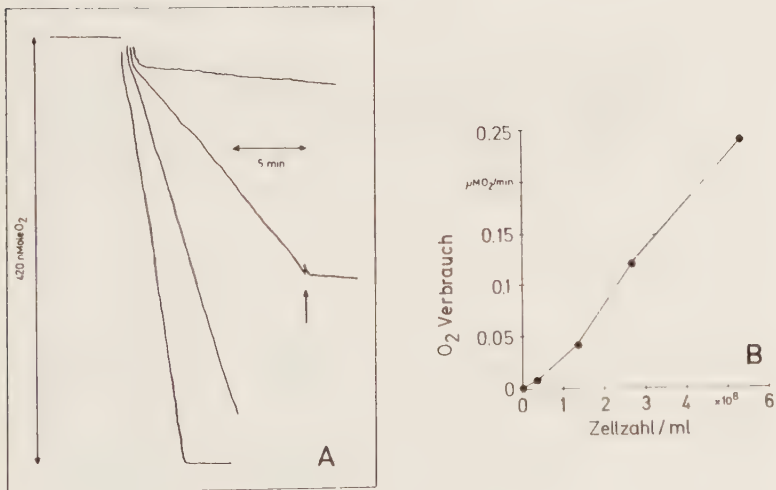


Fig. 11: Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs einer *Saccharomyces cerevisiae* Zellsuspension von der Zelldichte

Probenvolumen 2ml. Die dem Schreiberdiagramm (A) entnommenen O_2 -Verbrauchsraten sind in (B) aufgetragen. Zu dem mit einem Pfeil in Bild (A) bezeichneten Zeitpunkt wurde die KCN-Konzentration auf $2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ gebracht.

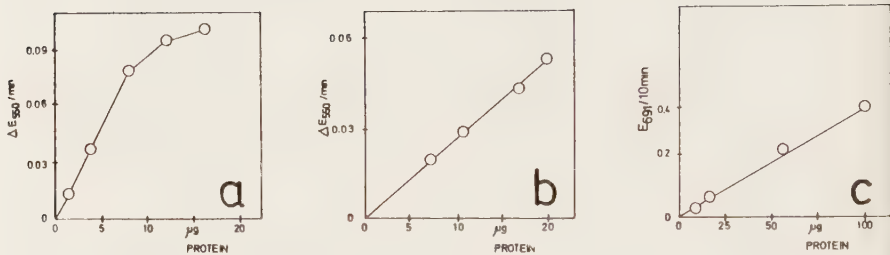


Fig. 12: Enzymabhängigkeit des Cytochrom c Oxidase-(a), NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-(b) und des ATPase-(c) Tests

Versuchsbedingungen wie in Material und Methoden beschrieben.

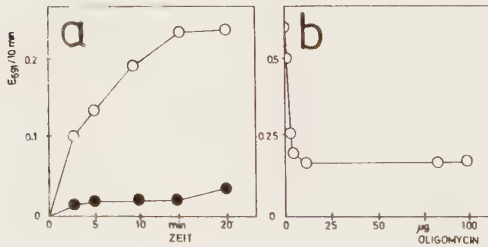


Fig. 13: ATP-Abhängigkeit (a) sowie Oligomycin-Empfindlichkeit (b) der ATPase

Versuchsbedingungen wie in Material und Methoden beschrieben. Reaktion mit (o) bzw. ohne (●) ATP-Zusatz. Oligomycin, wie in der Figur angegeben, wurde dem Reaktionsansatz gleichzeitig mit dem Enzympräparat zugemischt.

Die bei der Untersuchung von 84 Mutanten aus insgesamt 44 verschiedenen Komplementationsgruppen erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt. Man sieht, daß bei einem Teil der Mutanten Komplementationsgruppen-spezifisch die Atmungsfähigkeit erhalten bleibt, obwohl auf Laktat kein Wachstum mehr möglich ist. Dieser Effekt wurde in anderem Zusammenhang (52), jedoch nicht in der vorliegenden Arbeit weiter verfolgt. Man sieht weiter in Tab. 1, daß alle Mutanten, die bei 36°C noch atmeten (vgl. z.B. die Gruppen 5, 10, 12 und 14), auch die volle Aktivität aller untersuchten Atmungskettenenzyme behielten. Bei allen anderen Gruppen wurden teils spezifische Verluste einzelner, teils gleichzeitige Verluste mehrerer Enzymaktivitäten beobachtet. So fehlt z.B. bei den Gruppen Nr. 4 und Nr. 36 sowie bei verschiedenen Einzelmутanten spezifisch die Cytochrom c Oxidase-Aktivität. Bei der Gruppe Nr. 11 wurde ein spezifischer Defekt der NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-Aktivität festgestellt. Gruppen, welche mehrere Enzymaktivitäten gleichzeitig verloren hatten, sind z.B. Nr. 2, 48, 49 und 88, bei denen sowohl die Cytochrom c Oxidase- wie auch die NADH-Cytochrom c Reduktase-Aktivität fehlt. Weiterhin wurden Mutanten gefunden, die sowohl die Cytochrom c Oxidase-, und Reduktase- wie auch noch die ATPase-Aktivität verloren hatten (Gruppen Nr. 23, 67 und einige Vertreter der Gruppe 1). Umgekehrt besaß eine Gruppe (Nr. 19) noch alle drei getesteten Aktivitäten, obwohl die Zellen insgesamt atmungsdefizient waren.

Grundsätzlich sollten die biochemischen Eigenschaften von Mutanten innerhalb derselben Komplementationsgruppe dieselben sein, d.h. ein bestimmter biochemischer Defekt sollte Komplementationsgruppen-spezifisch auftreten. Tatsächlich zeigt Tab. 1, daß sich diese Er-

Tab. 1: Untersuchung von Atmungsrate (c), ATPase-(d), Cytochrom c Oxidase-(e), NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-(f), Aktivität und ρ° -Gehalt (g) von petts-Mutanten (a) verschiedener Komplementationsgruppen (b).

Jede Mutante wurde als genetisch reiner Klon in 30 ml YEP-Medium bei 36°C bis zum Erreichen der frühen stationären Phase angezüchtet. Atmungsraten und ρ° -Gehalt wurden mit den ausgewachsenen Kulturen direkt gemessen. Die verschiedenen Enzymaktivitäten wurden mit Präparationen submitochondrieller Partikel, die aus den abgeernteten Zellen nach der in Material und Methoden beschriebenen Methode gewonnen wurden, gemessen.

a	b	c	d	e	f	g			
WT		123	+	(2.2)	+	(8.2)	+	(6.8)	1
86	1	o	o	-	(0.8)	+	(5.3)	100	
321		o	+	(1.3)	+	(0.9)	+	(4.5)	100
1016		o	+	(2.0)	-	(0.7)	+	(3.4)	1
1147		o	-	(0.1)	-	(0.5)	-	(0.01)	1
1201		o	o	(0.5)	-	(0.2)	-	(0.1)	10
1266		o	-	(0.4)	-	(0.3)	+	(7.6)	1
1286		o	+	(1.6)	-	(0.7)	-	(0.07)	80
1296		o	+	(1.8)	-	(0.5)	o	(2.3)	50
1316		o	+	(1.5)	o	(0.5)	-	(0.03)	
1335		o	+	(1.8)	-	(0.3)	-	(0.6)	
1418		o	+	(1.3)	-	(0.3)	o	(1.2)	100
1420		o	-	(0.3)	-	(0)	-	(3.5)	10
1463		o	+	(1.1)	-	(0.1)	-	(0.2)	
1513		o	-	(0.3)	-	(0.2)	-	(0.3)	90
1508	2	o	+	(1.2)	-	(0.1)	-	(0.1)	92
1549		o	+	(1.5)	-	(0.2)	-	(0.1)	
1583		o	+	(1.5)	-	(1.0)	-	(0.5)	10
413	3	o	+	(1.8)	o	(1.3)	o	(1.3)	1
1098		o	+	(1.5)	-	(0.2)	-	(1.8)	2
1350		o			-	(0.1)	-	(0.5)	
1596		o	+	(1.3)	-	(0)	o	(1.7)	100
1414		o	o	(1.0)	-	(0.3)	o	(2.1)	1
17	4	5	+	(0.9)	-	(0.6)	+	(5.8)	1
106		o	+	(1.0)	-	(0.1)	+	(4.3)	1
108		o	+	(0.9)	-	(0.2)	+	(4.7)	1
203		2	+	(1.0)	-	(0.1)	+	(3.6)	1
634		o	+	(1.3)	-	(0.3)	+	(5.1)	1
1202		22	+	(1.4)	-	(0.3)	+	(5.5)	1
1336		o	+	(0.8)	-	(0.2)	+	(4.3)	1
1541		o	+	(0.8)	-	(0.2)	+	(3.2)	1
1575		o	+	(1.7)	-	(0.2)	+	(3.5)	1

a	b	c	d	e	f	g
545	5	4		- (4.8)	+ (5.3)	
1100		77		+ (6.4)	+ (4.8)	
1119		74		+ (7.2)	+ (5.8)	
1244		42		+ (6.1)	+ (5.0)	
453	7			+ (5.1)	+ (4.7)	
1023	8	0	+ (3.1)	- (0.03)	+ (4.5)	20
1325		0	+ (0.9)	- (0.1)	0 (3.7)	1
1371		0	+ (2.0)	- (1.1)	+ (7.5)	1
1396		0	0 (0.6)	- (0.65)	0 (3.5)	20
320	9	0	+ (0.95)	- (0.08)	- (0.04)	
1156		0	+ (0.8)	- (0.03)	- (0.1)	
1260		0		- (0.75)	- (0.8)	
1479		0		- (0.9)	- (4.0)	
724	10	19	+ (2.0)	+ (7.0)	+ (5.5)	
1227		68	+ (1.8)	+ (5.1)	+ (3.4)	
1537		21	+ (2.1)	+ (5.0)	+ (4.0)	
1552		30	+ (1.9)	+ (5.4)	+ (5.7)	
267	11	0	+ (1.0)	+ (5.7)	- (0.02)	
1087		0	+ (0.8)	+ (4.6)	- (0.1)	
1237		0	- (0.03)	- (0.4)	- (0.3)	
1524		0	+ (1.5)	- (0.5)	- (0.05)	
578	12	29	+ (2.9)	+ (3.8)	+ (4.6)	
1360		24		+ (8.6)	+ (6.3)	
1597		25		+ (5.1)	+ (6.2)	
1033	13			+ (5.3)	+ (2.8)	
1580				- (0.5)	+ (5.8)	
383	14	65		+ (5.3)	+ (6.4)	
591		40		+ (6.5)	+ (5.7)	
1221		42				
1276		72		+ (7.5)	+ (5.5)	
1042	17			- (0.5)	+ (4.4)	
1594				- (0.8)	- (0.2)	
1194	18	0	+ (4.7)	- (0.7)	+ (3.5)	1
1503		31	+ (1.5)	- (0.7)	- (0.03)	
1604		0				
1438	19	0	- (1.75)	+ (8.0)	+ (6.0)	1
74	20	11		+ (6.2)	+ (5.8)	
1590		13		+ (4.8)	+ (6.1)	
1416	21	67		+ (5.3)	+ (4.2)	
1017	23	0	- (0.2)	- (0.36)	- (0.15)	1
1563	24			+ (2.3)	+ (3.5)	

a	b	c	d	e	f	g
9	25	o	+ (0.9)	- (0.1)	+ (2.8)	80
1440		o	o (0.6)	+ (4.0)	+ (3.0)	1
1014	29			+ (8.6)	+ (6.2)	
1022	30	o	+ (2.3)	+ (6.0)	+ (4.0)	
1527		14	+ (4.8)	+ (5.8)	+ (4.6)	
1048	31	105		+ (7.1)	+ (5.6)	
1074	32	47		+ (2.0)	+ (6.2)	
1107	34	o	- (0.01)	- (0.3)	- (0.1)	
1578		o	o (0.4)	- (0.2)	o (1.6)	1
1475	36	o	+ (20)	- (0.8)	+ (5.2)	15
1331	39	25		- (0.6)	- (0.2)	
1424	40	o	- (0.01)	- (0.3)	- (0.15)	
1426	41	o	+ (2.2)	- (0.1)	- (0.1)	1
1476	43	o	+ (4.3)	+ (3.8)	- (0.2)	20
1010	47	o	o (0.4)	o (1.7)	o (1.5)	1
1012	48	o	+ (1.7)	- (0.2)	- (0.25)	1
1035	49	o	+ (1.65)	- (0.3)	- (0.05)	1
1050	50	50		+ (6.0)	+ (4.6)	
1080	56	o	+ (0.74)	- (0.6)	+ (5.8)	
1099	57	o		+ (5.5)	+ (4.8)	
1106	58	56		+ (6.4)	+ (4.7)	
1144	63	o	- (0.25)	+ (4.8)	- (0.7)	20
1160	64		+ (1.52)	+ (5.7)	o (1.8)	100
1186	67	o	- (0)	- (0.1)	- (0.1)	10
1192	68	o		- (0.1)	+ (5.3)	100
1200	70	o	+ (2.5)	- (0.35)	- (0.5)	
1204	71	78		+ (8.4)	+ (4.8)	
1213	73	46		+ (7.6)	+ (4.3)	
1231	75	o	- (0.19)	- (0.5)	- (0.5)	
1236	76	144		+ (7.2)	+ (4.4)	
1252	77	o	+ (1.4)	- (0.4)	- (0.05)	
1282	79	69		+ (5.7)	+ (4.6)	
1294	82	1		+ (5.0)	+ (3.7)	
1347	86	4		- (1.0)	+ (5.7)	

a	b	c	d	e	f	g
1364	88	0	+ (3.1)	- (0.2)	- (0.01)	1
1384	89	0	- (0.6)	- (0.8)	- (0.3)	
1391	90	21	- (0.8)	- (0.5)	+ (7.0)	
1412	91	14		+ (6.6)	+ (5.0)	
1074	93	47	+ (1.6)	+ (6.2)	+ (5.5)	
1533	100	4	+ (1.6)	- (0.1)	+ (4.6)	100
1570	103	19		+ (5.8)	+ (4.4)	
1590	105	46		- (0.1)	- (0.08)	
1599	106	0		- (0.08)	- (0.2)	

wartung bei den meisten pet-Komplementationsgruppen bestätigt. Dies gilt vorallem für die Retention der Atmungsfähigkeit, weiterhin für die Mutanten, welche spezifisch die Cytochrom c Oxidase- (Gruppe 4 und 36) oder die NADH-Cytochrom c Reduktase-Aktivität (Gruppe 11) verloren haben, ebenso für die Tendenz einer Kultur, bei 36°C relativ rasch einen sehr hohen Anteil rho⁻-Zellen auszubilden (Gruppe 1, 2, 64 und 68). Daneben beobachtet man jedoch auch bei einer ganzen Reihe von Gruppen, z.B. Gruppe 1, 3 und Gruppe 8 ein verhältnismäßig breit gestreutes Spektrum verschiedenartiger biochemischer Defekte. In allen Fällen handelt es sich hier um Mutanten mit einem mehrfach defekten biochemischen Phänotyp, wobei das Ausmaß des gleichzeitigen Ausfalls verschiedener mitochondrieller Funktionen bei den einzelnen Vertretern ein und derselben Komplementationsgruppen unterschiedlich sein kann. Auf die Ursache für ein solches unterschiedliches Verhalten wird weiter unten in dieser Arbeit bei der Besprechung der Inaktivierungskinetik verschiedener Mutanten näher eingegangen werden.

2. Kinetische Untersuchungen zum Verlust der Atmungsfähigkeit und der Aktivität verschiedener mitochondrieller Enzyme in pet-ts-Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur.

Die Ergebnisse der ersten, in Tab. 1 dargestellten biochemischen Untersuchungen von verschiedenen pet-ts-Mutanten hatten gezeigt, daß in vielen Fällen ein bestimmter genetischer Defekt zum Ausfall mehrerer biochemischen Funktionen führen kann. Die dabei beobachteten Unterschiede zwischen Mutanten ein und derselben Komplementationsgruppe deuteten daraufhin, daß es sich

hier um eine Schädigung handeln könnte, deren Ausmaß zum Teil von der Zeitdauer bestimmt wird, welche eine Mutante unter nicht-permissiven Bedingungen verbringt. Bekanntlich können die Wachstums- und Teilungs-Charakteristika verschiedener Mutanten - wahrscheinlich bedingt durch unabhängige zusätzliche Mutationen in anderen, die Teilungsfähigkeit der Zelle betreffenden Genen - sich drastisch voneinander unterscheiden. Solche Mutanten werden daher innerhalb eines identischen Inkubations-Zeitraum durchaus verschiedene physiologische Veränderungen durchlaufen, die sich unter anderem auch in einem unterschiedlichen Ausmaß der phänotypischen Ausprägung eines genetischen Defektes manifestieren können. Aus diesem Grund erschien es angebracht, in den fraglichen petts-Mutanten den Verlust bestimmter Enzymaktivitäten auch in Abhängigkeit von der unter nicht-permissiven Bedingungen verbrachten Kultivationsdauer zu untersuchen.

Da bekannt ist, daß die Aktivität der Enzyme der Atmungskette ganz entscheidend von der Wachstumsphase der Kultur wie auch von der Zusammensetzung der Nährlösung (z.B. Glukosekonzentration) abhängt, waren wir darauf bedacht, Veränderungen derartiger äußerer Parameter während der Kultivation möglichst auszuschließen. Dies wurde erreicht durch Verwendung eines Chemo-staten, in dem durch kontrolliertes Zupumpen frischer Nährlösung die Zelldichte der Kultur während der gesamten Dauer des Versuchs konstant gehalten wurde. Auch bei manueller Kontrolle der Pumpen blieben die maximalen Abweichungen von der vorgegebenen Zelldichte, insbesondere nach Temperaturerhöhung auf 36°C gewöhnlich unter 10 %. Auf diese Weise konnten meist 6 Kulturen gleichzeitig angezogen und auf die Veränderung

ihrer Enzymmuster hin untersucht werden. Damit befanden sich die Kulturen ständig in derselben Wachstumsphase (gewöhnlich am Ende der log-Phase) während bei ihrer Anzucht im diskontinuierlichen Verfahren stets alle Wachstumsphasen durchlaufen worden waren.

Außer den Veränderungen von Enzymaktivitäts-Mustern in der Inneren-Mitochondrien-Membran wurden bei einigen Mutanten auch Serienspektren der verschiedenen Cytochrome im Verlauf des Übergangs vom Atmungs-kompetenten in den defekten Zustand aufgenommen. Abgesehen von Defekten innerhalb des allgemeinen Häm-Biosyntheseweges, welche sich in einem allgemeinen Fehlen aller Cytochrom-Absorptionsbanden manifestieren würden, können folgende Defekte als Ursachen für spezifische Veränderungen bestimmter Cytochrome diskutiert werden:

1. Eine Proteinkomponente, welche für den Einbau des betreffenden Häms in einen bestimmten Komplex der Atmungskette verantwortlich ist, wird entweder nicht mehr synthetisiert, oder sie besitzt eine inaktive Konformation, die sie nicht mehr als Häm-Akzeptor fungieren läßt;
2. Proteinkomponenten, welche durch ihre Wechselwirkungen mit den π -Elektronen des Porphyrinring-Systems die charakteristischen spektralen Eigenschaften eines bestimmten Cytochroms mitbestimmen, werden entweder nicht mehr synthetisiert oder die erwähnten Wechselwirkungen haben sich auf Grund konformationeller Veränderungen des Proteins geändert;

3. Spezifische Enzyme, welche das Protoporphyrin-Ringsystem mit den charakteristischen Seitengruppen bestimmter Cytochrome versehen oder gegebenenfalls deren kovalente Verknüpfung mit einer bestimmten Proteinkomponente besorgen, sind durch Mutation inaktiviert worden.

Es muß allerdings festgestellt werden, daß ein enzymatischer Defekt einer Cytochrom-Komponente der mitochondrialen Atmungskette grundsätzlich auch ohne gleichzeitige Veränderung der spektralen Eigenschaften dieser Komponente möglich erscheint.

In diesen und allen folgenden kinetischen Studien dieser Arbeit wurde der Verlust bestimmter enzymatischer Funktionen in Abhängigkeit von der Kultivationsdauer - ausgedrückt in Stunden - der Mutantenzellen bei 36°C untersucht. Die wiedergegebenen Kinetiken machen keine Angaben zur Zahl der innerhalb des Versuchszeitraums durchlaufenen Generationen. Erfahrungsgemäß besaßen die meisten Mutanten nicht - wie man hätte erwarten können - eine für 22°C und eine für 36°C charakteristische und jeweils gleichbleibende Generationszeit. Wie weiter unten (vgl. S.111) noch ausführlicher diskutiert werden wird, nimmt unter nicht-permissiven Bedingungen in den meisten Fällen die Generationsdauer kontinuierlich zu. Trotzdem kann auf Grund von Erfahrungen, die in anderen Zusammenhang gemacht wurden (53) gesagt werden, daß die hier untersuchten Temperatur-sensitiven pet-Mutanten ca. 2-4 Generationen nach der Temperaturerhöhung ihre Atmungsfähigkeit verloren hatten. Dieses Ergebnis spricht eher für ein "Ausverdünnen" funktionsfähiger Enzyme nach dem Temperatursprung als für eine temperaturbedingte Inaktivierung präexistierender Strukturen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung im einzelnen sind in den Fig. 14-75 dargestellt. Sie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Es wurden 7 Gruppen mit einem spezifischen Verlust der Cytochrom c Oxidase gefunden. Es handelt sich um die Gruppen Nr. 4, 36, 56, 70, 77 und 100 (vgl. Fig. 14-24). Der Verlust der Enzymaktivität ging in diesen Mutanten parallel mit dem Verlust der Atmungsfähigkeit, während die anderen Enzymaktivitäten erhalten blieben, manchmal sogar anstiegen. Bei allen Mutanten war die Atmung und Cytochrom c Oxidase-Aktivität nach 20 Std. auf ungefähr 25 % des Ausgangswertes abgesunken. Die Tieftemperatur-Serienspektren der Mutante ts-17 (Fig. 76) zeigten, daß parallel zu spezifischen Inaktivierung der Cytochrom Oxidase die Cytochrom a-Bande bei 603 nm letztlich ganz verschwand. Allerdings trat gleichzeitig dazu auch eine deutliche Abnahme der Cytochrom c-Absorption bei 550 nm auf. Weiterhin wurde beobachtet, daß im Verlauf der Abnahme der Cytochrom a-Absorption bei 603 nm intermediär eine Absorptionsbande bei ca. 580 nm auftrat. Es muß offen bleiben, ob es sich hierbei um die Absorption von inaktivierter Cytochrom c-Oxidase handelt. Das Inaktivierungs-Verhalten der Mutanten der Komplementationsgruppe Nr. 4 ist somit ganz in Übereinstimmung mit den in Tab. 1 enthaltenen Ergebnissen der ersten Versuchsreihe.

Ein ähnliches Verhalten wie die Mutanten der Komplementationsgruppe Nr. 4 zeigten sechs weitere pet-ts-Mutanten, von denen jede einer anderen Komplementationsgruppe angehörte (ts-1475, ts-1080, ts-1200, ts-1252 und ts-1533; vgl. Fig. 20-24). Auch hier handelt es sich offenbar um spezifische

Cytochrom a-Defekte Mutanten. Auch dieses Ergebnis steht im Einklang mit den entsprechenden Daten in Tab. 1. Bei der Mutante ts-1252 allerdings beobachtet man ebenfalls eine allmähliche Abnahme der NADH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität, jedoch zu einem Zeitpunkt, wo dieser Defekt für den Verlust der Atmungsfähigkeit dieser Mutante nicht mehr verantwortlich gemacht werden kann.

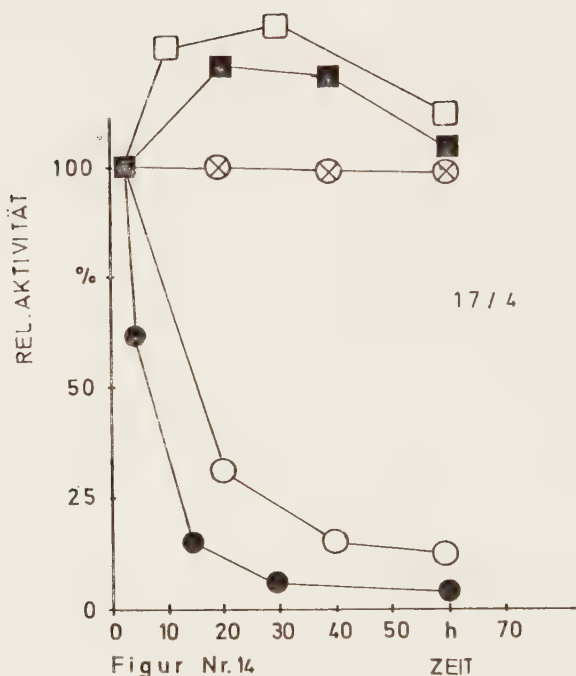
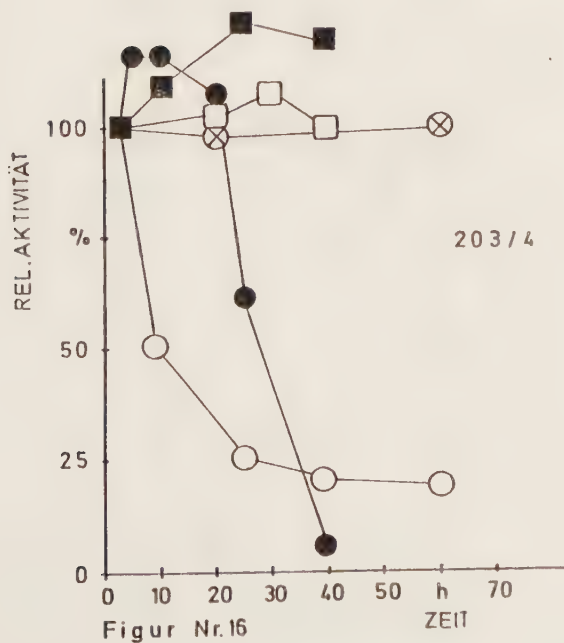
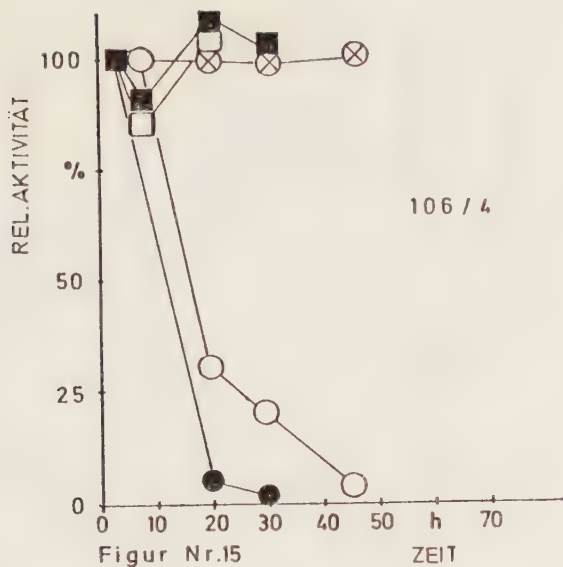
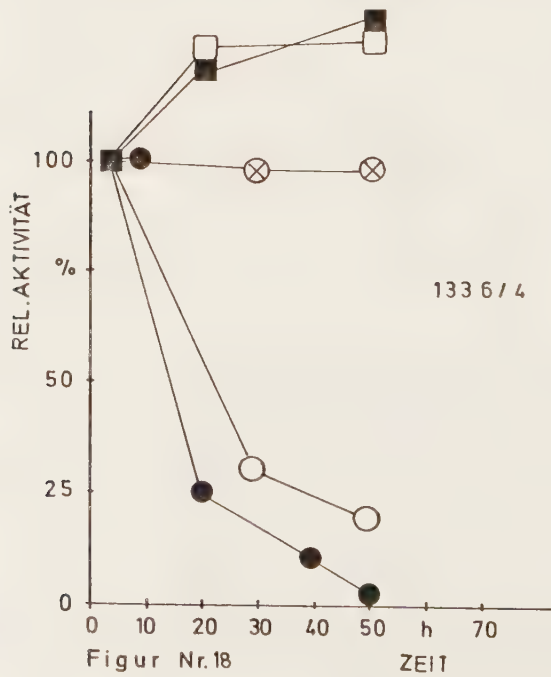
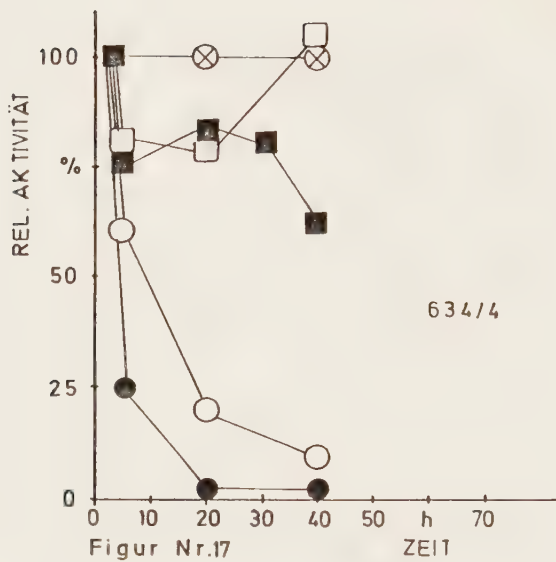


Fig. 14-75: Inaktivierungskinetiken von pet-ts-Mutanten in Chemostat-Kulturen nach sprunghafter Erhöhung der Inkubations-Temperatur von 22°C auf 36°C zum Zeitpunkt Null.

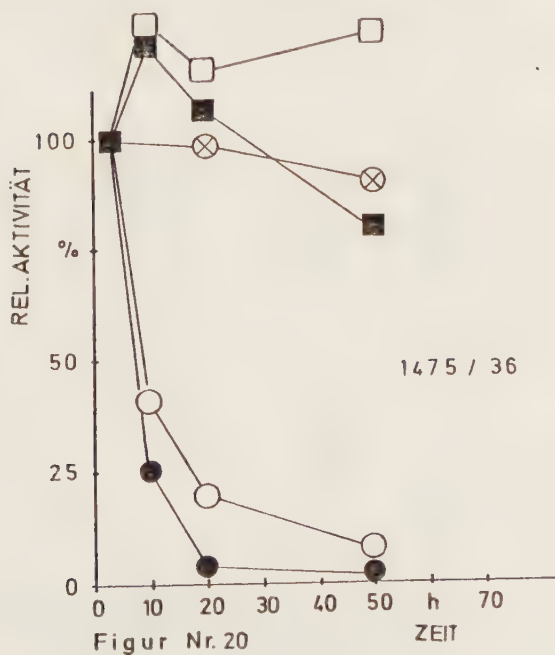
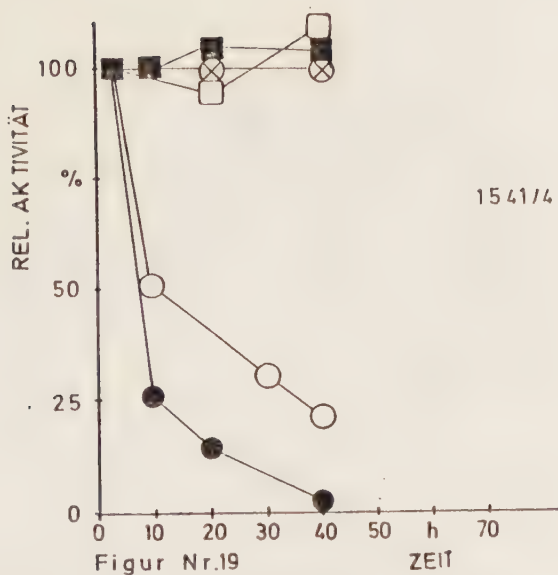
Zu den angegebenen Zeiten wurden dem 100ml Kulturen (vgl. Material und Methoden) jeweils 2ml-Proben für die Atmungsmessung (○) und 10ml für die Messung der Cytochrom Oxidase-(●), NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-(■), der ATPaseaktivität (□) und des rho⁻-Gehaltes (⊗) entnommen. Bezüglich experimenteller Einzelheiten vgl. Material und Methoden. Die Mutanten-Nr. befindet sich jeweils vor dem Schrägstrich, die Komplementationsgruppen-Nr. dahinter.



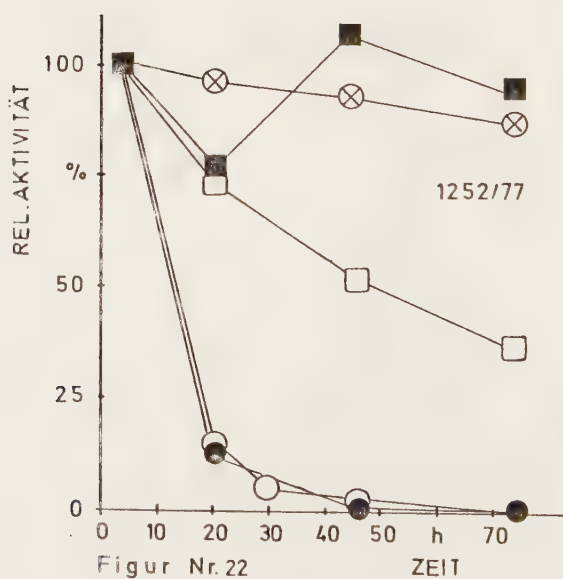
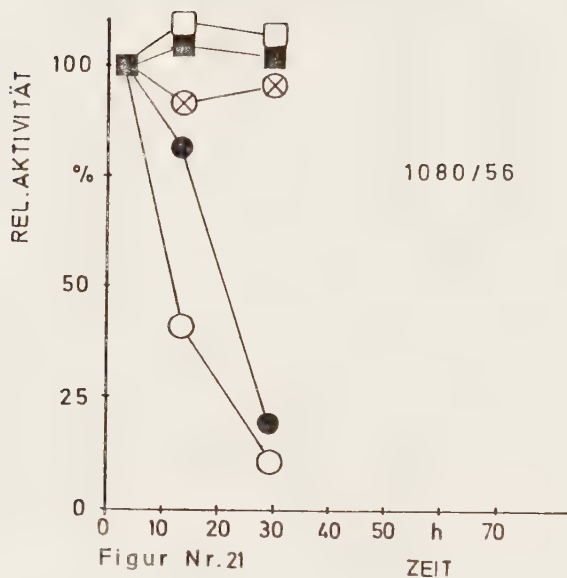
Legende s. Seite 54



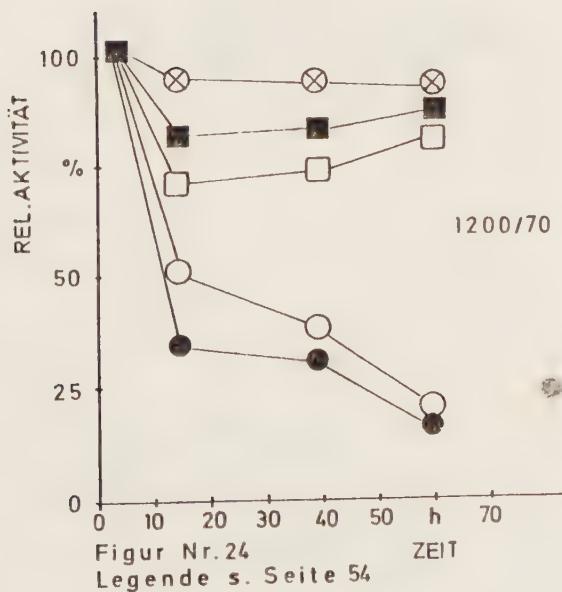
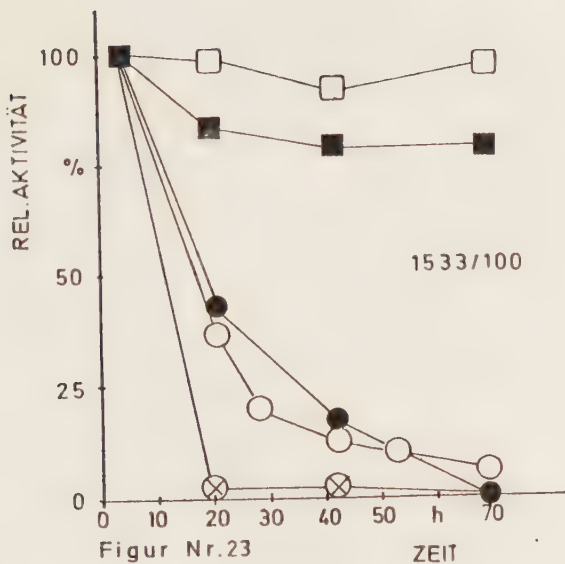
Legende s. Seite 54

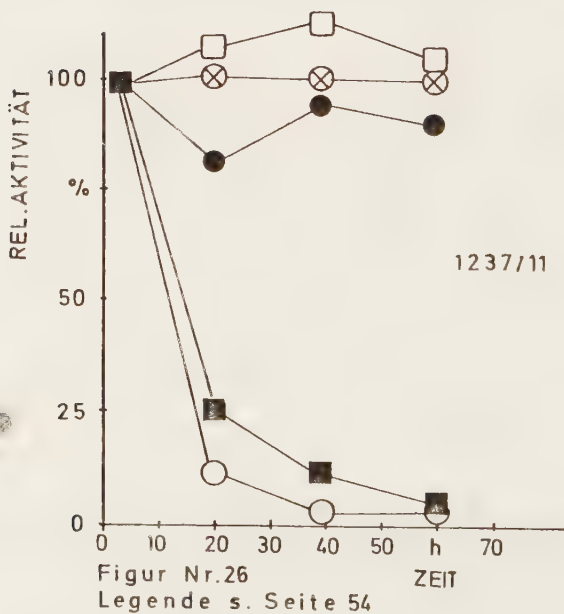
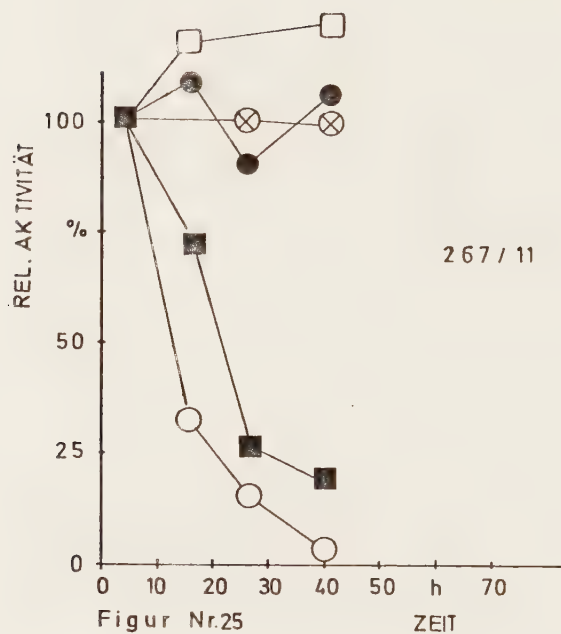


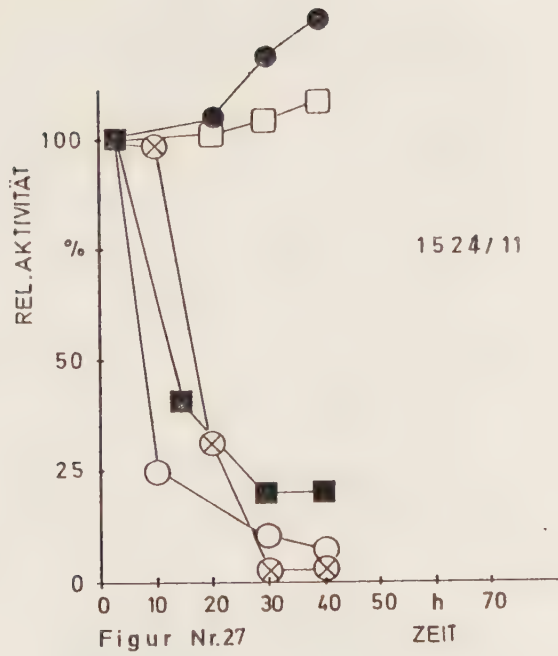
Legende s. Seite 54

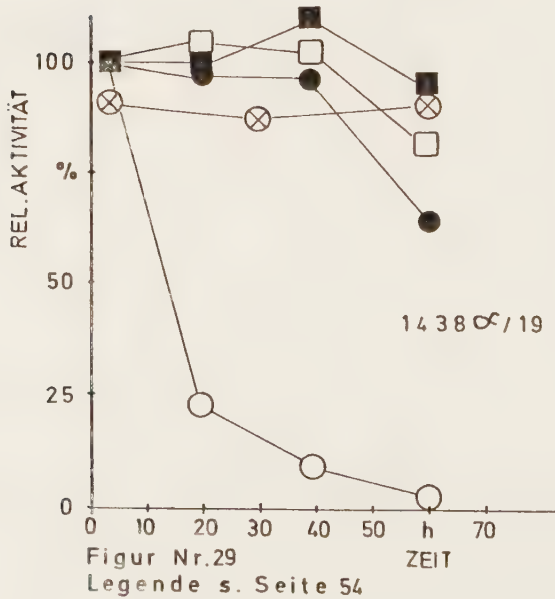
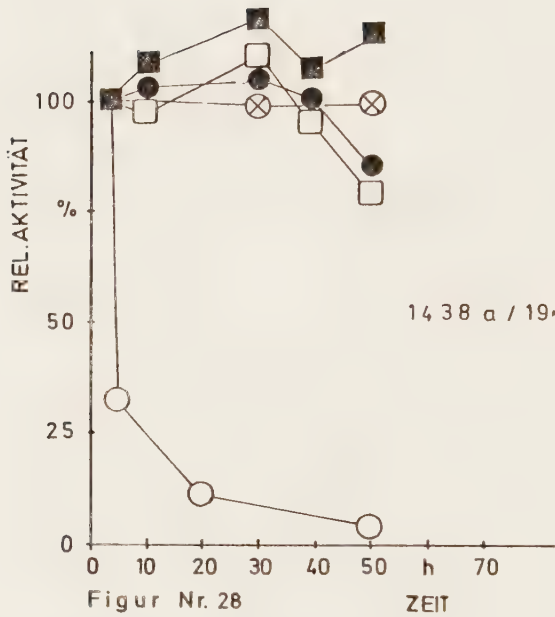


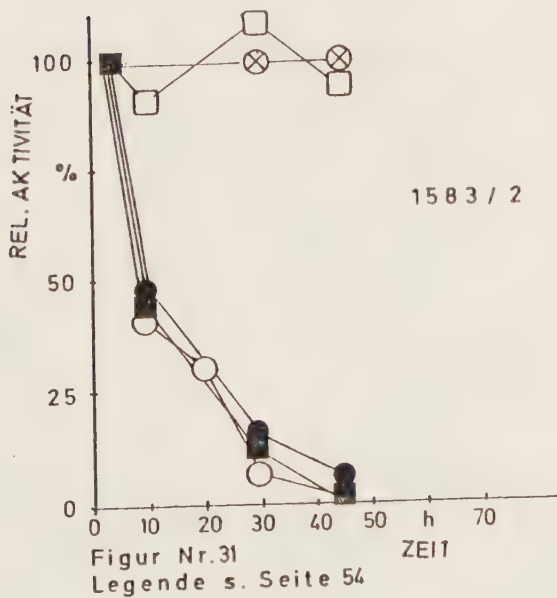
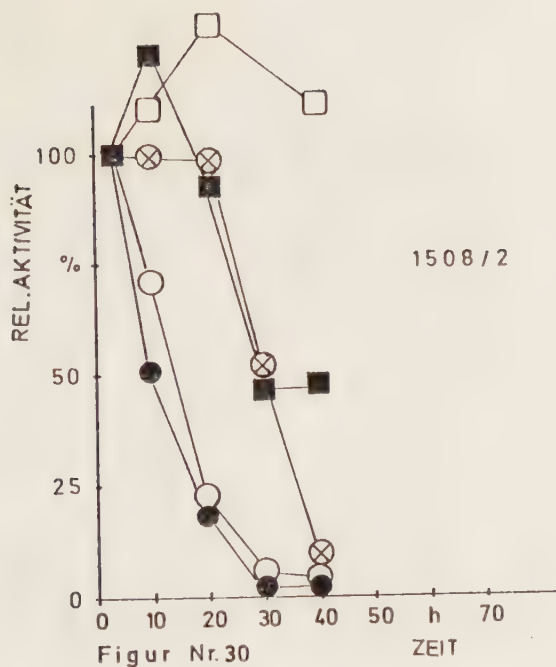
Legende s. Seite 54

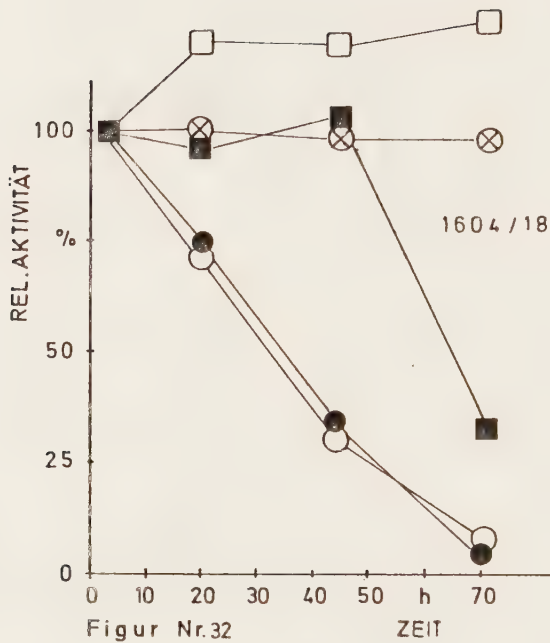




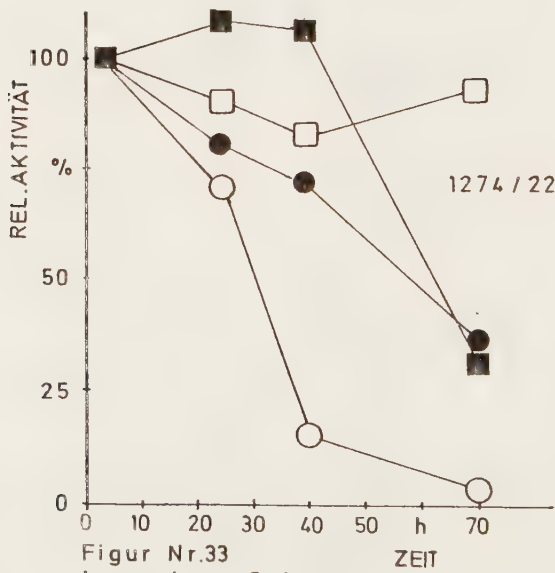






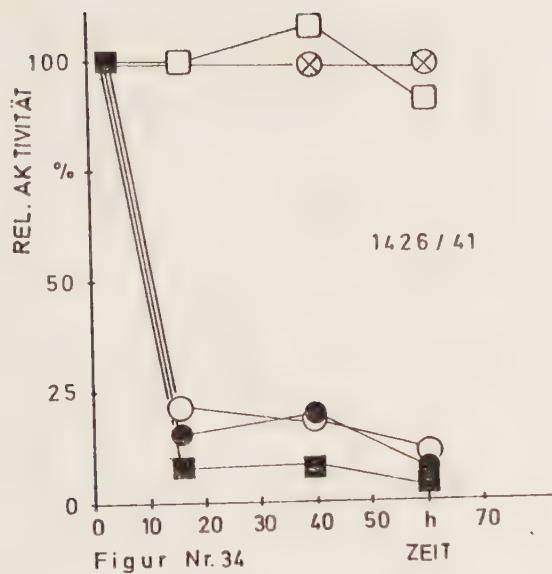


Figur Nr.32

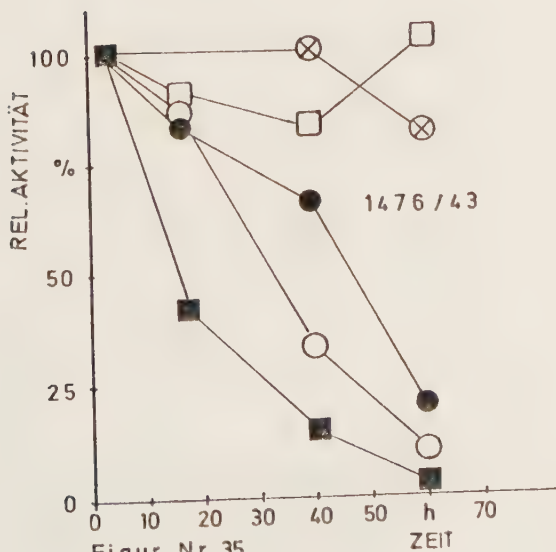


Figur Nr.33

Legende s. Seite 54

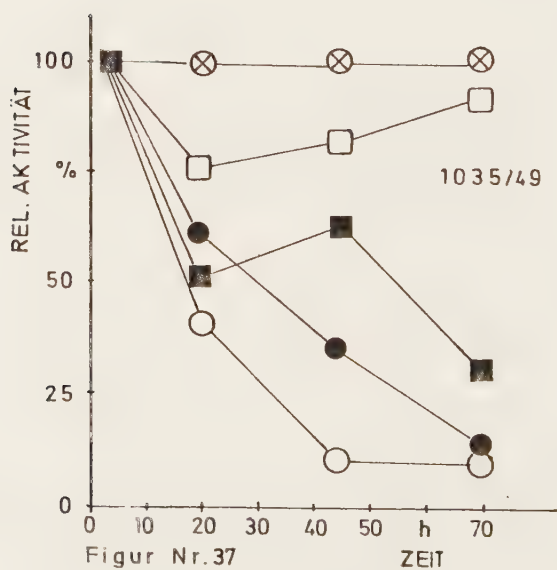
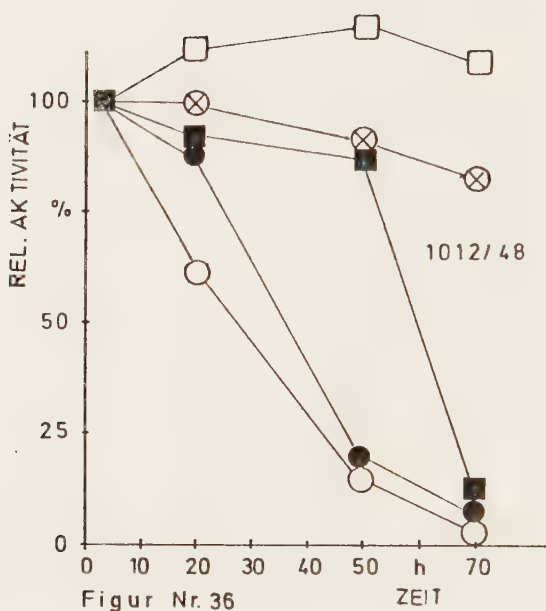


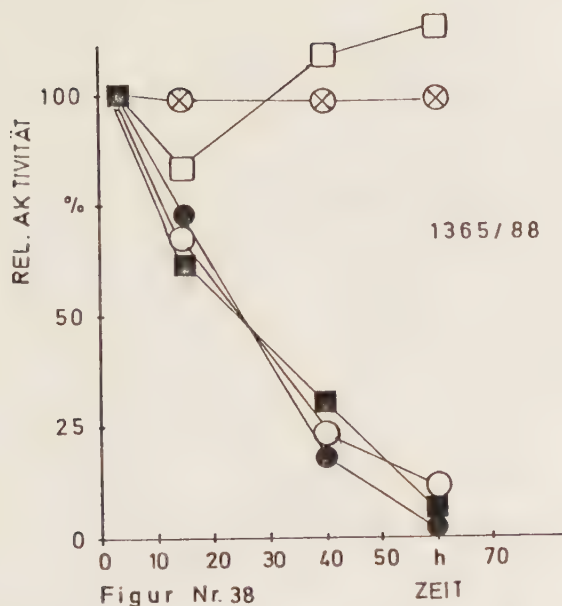
Figur Nr. 34



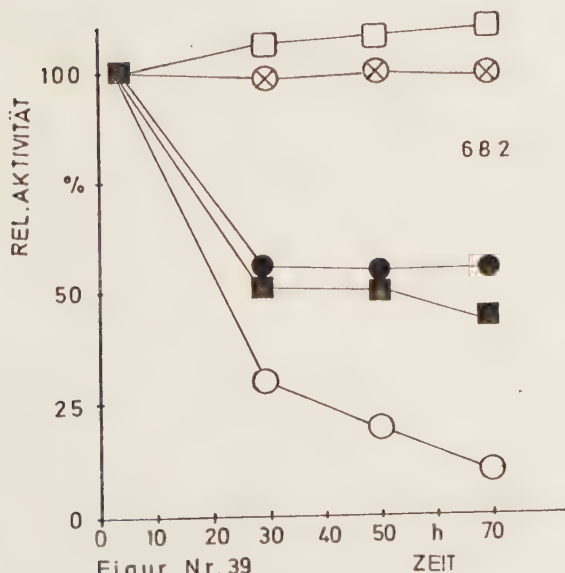
Figur Nr. 35

Legende s. Seite 54



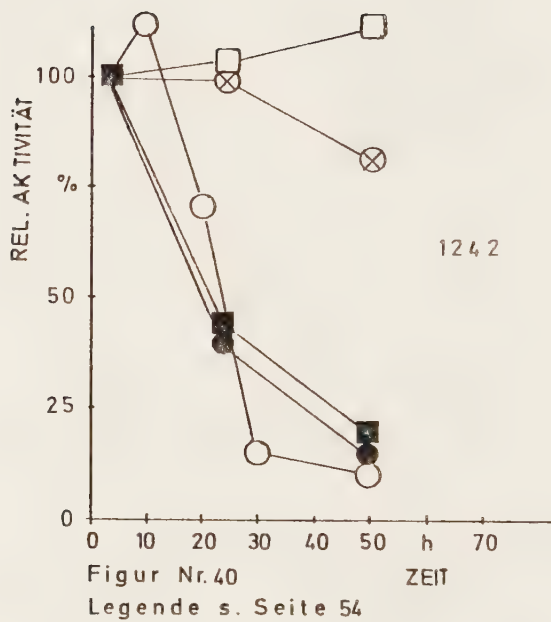


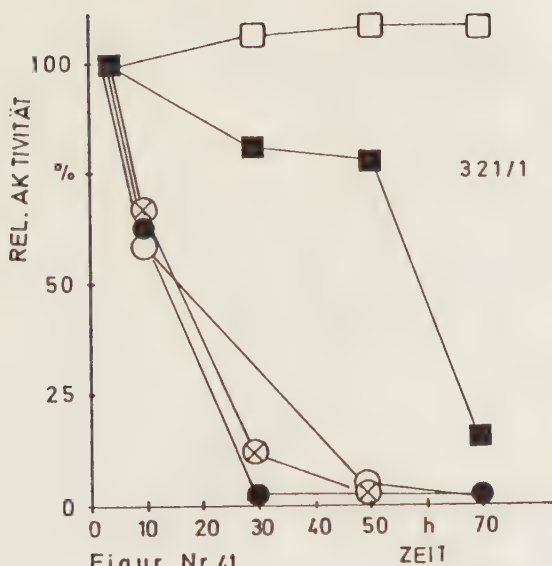
Figur Nr. 38



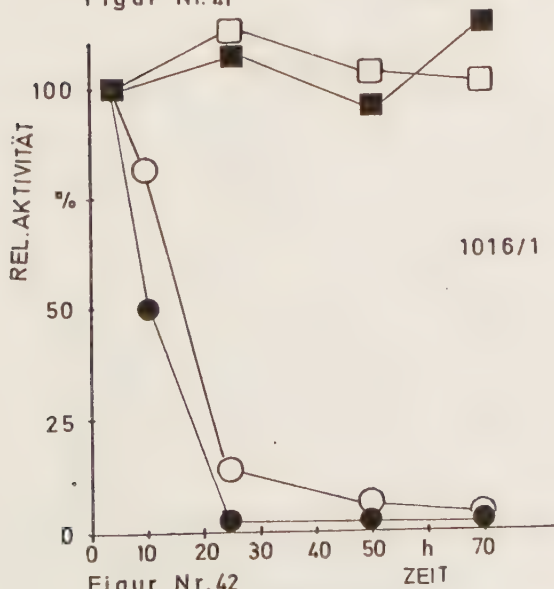
Figur Nr. 39

Legende s. Seite 54



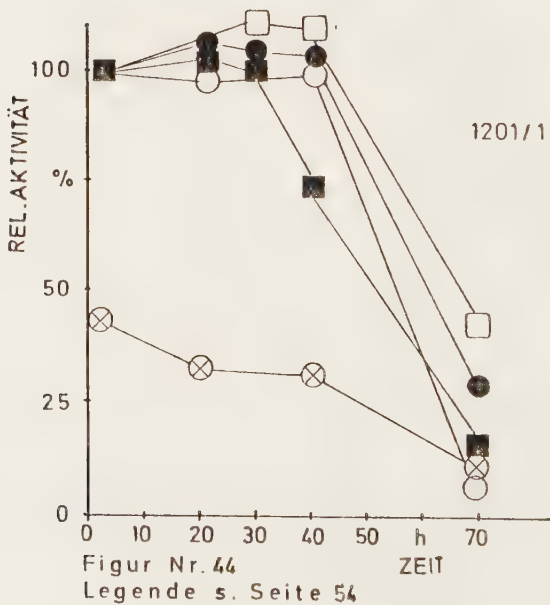
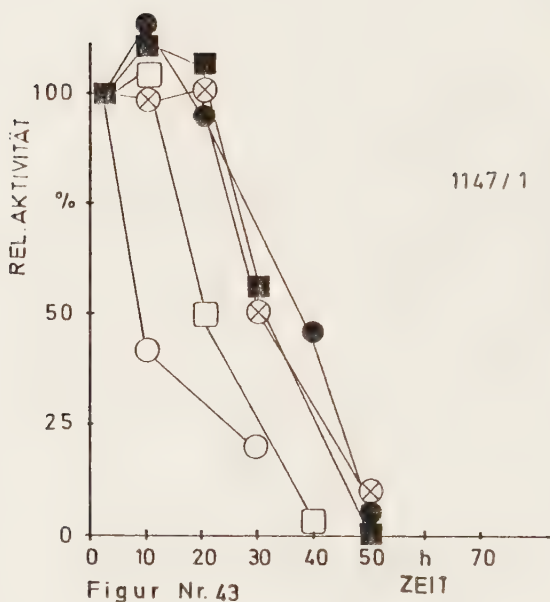


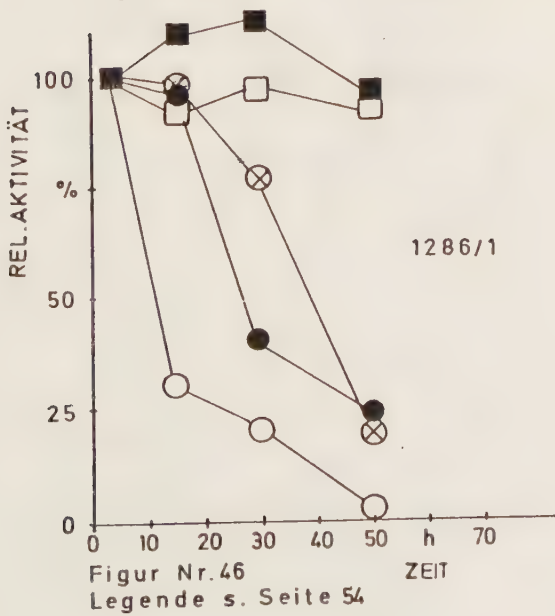
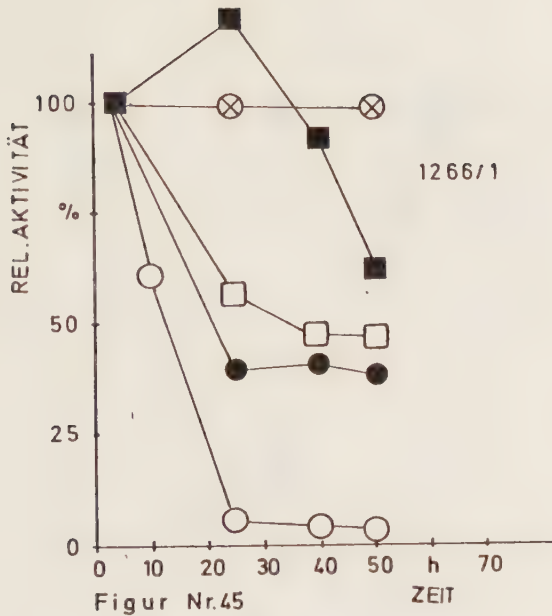
Figur Nr. 41

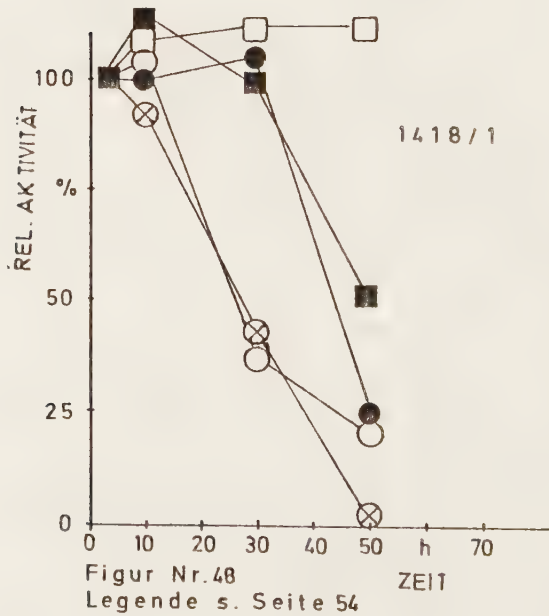
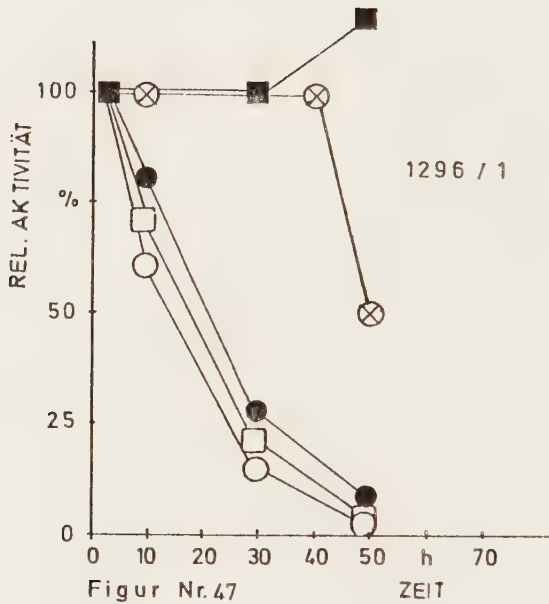


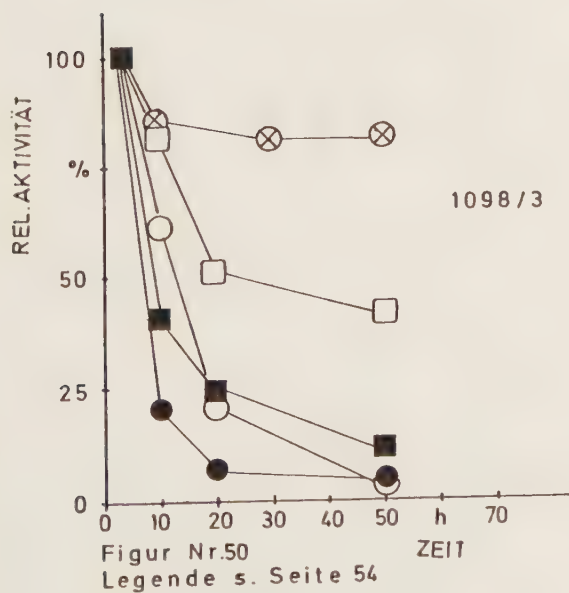
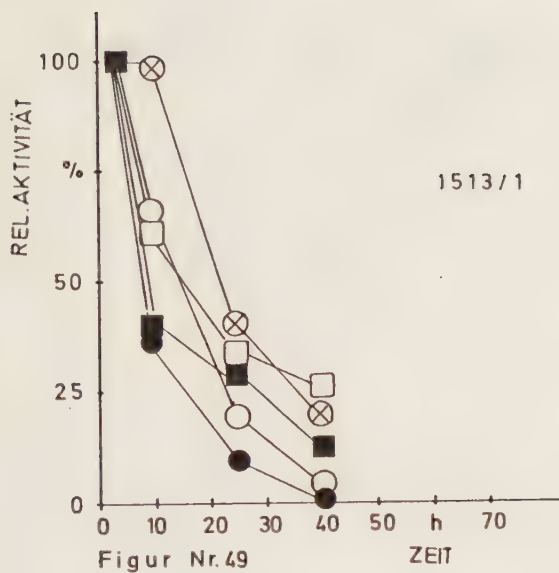
Figur Nr. 42

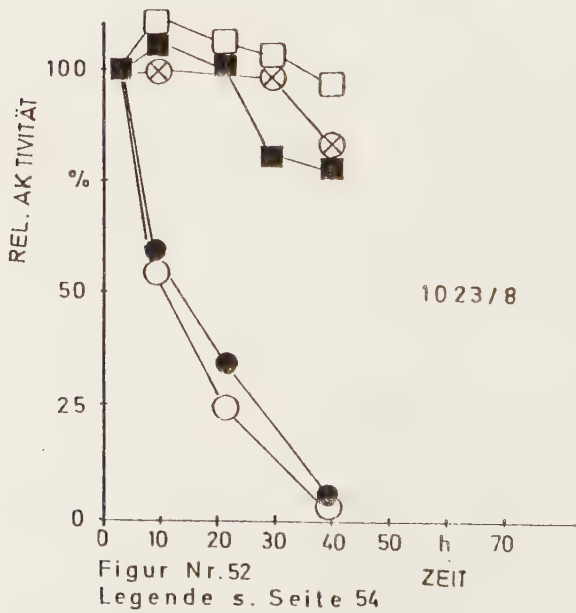
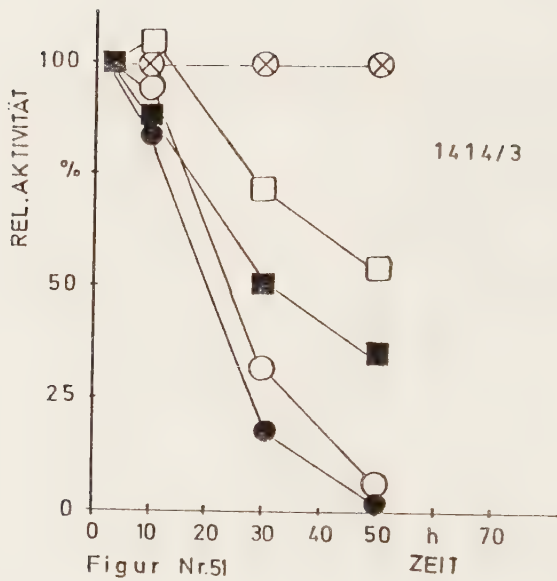
Legende s. Seite 54

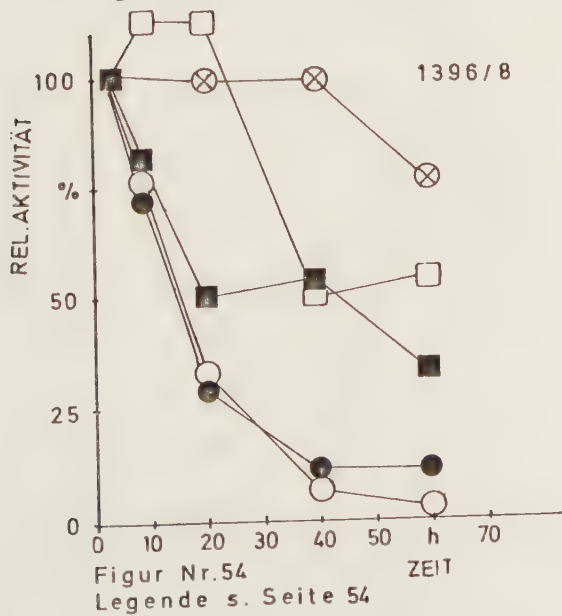
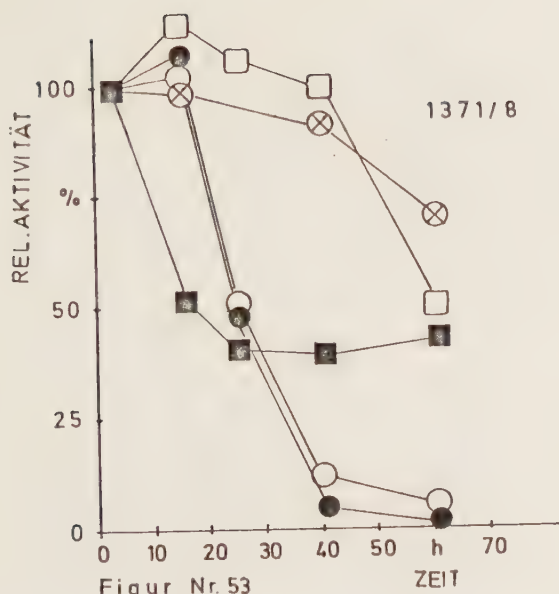


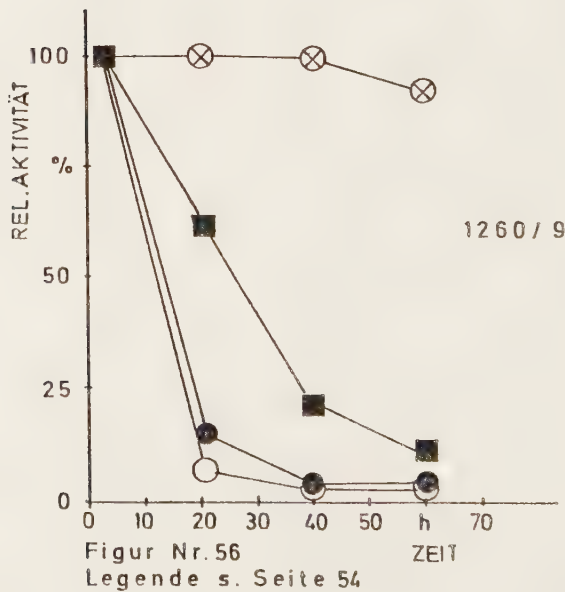
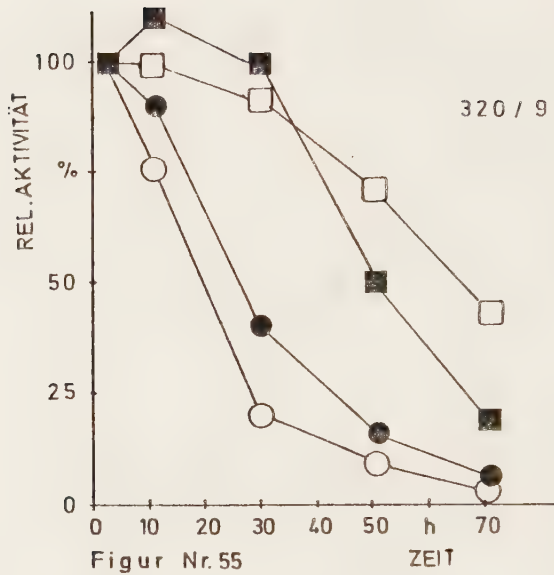


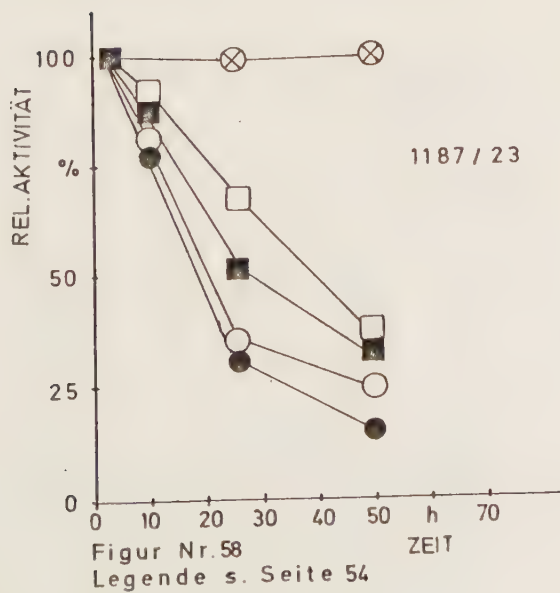
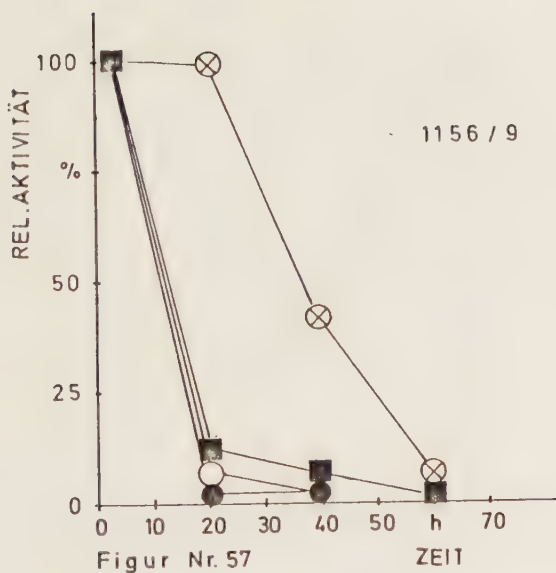


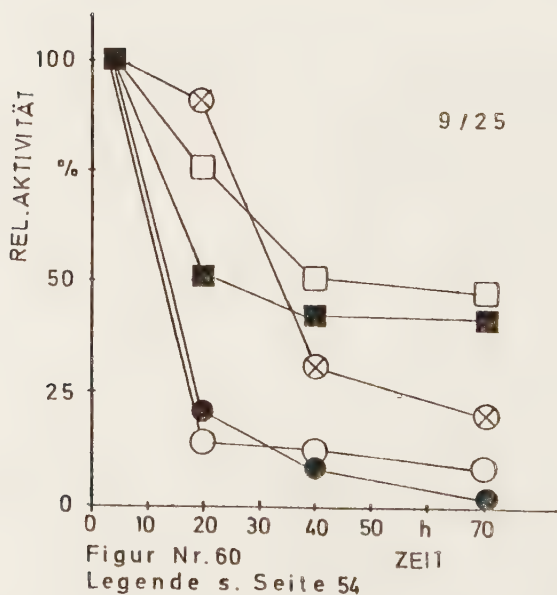
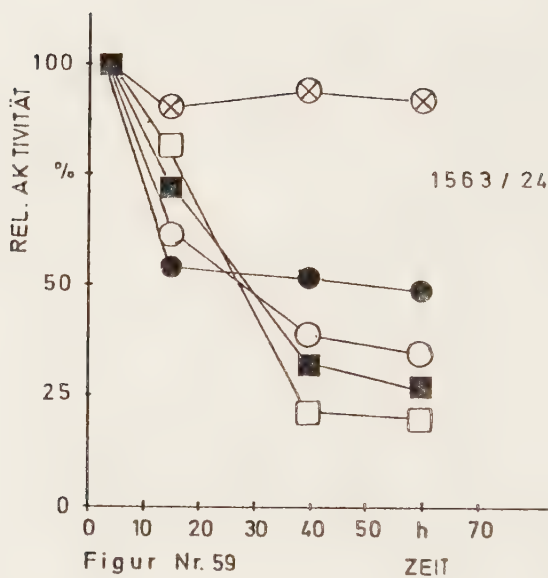


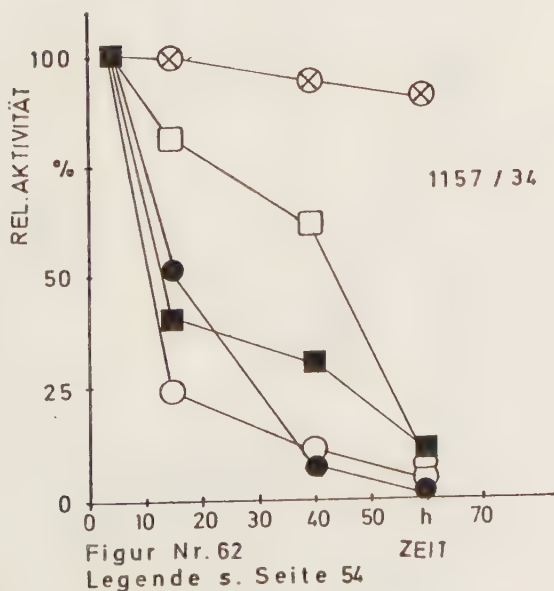
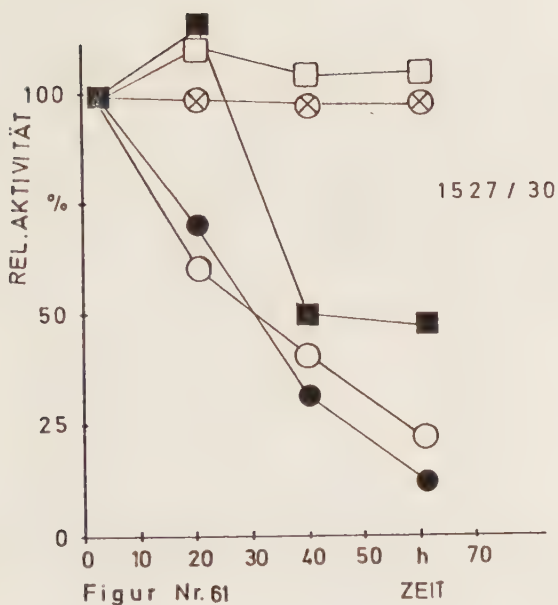


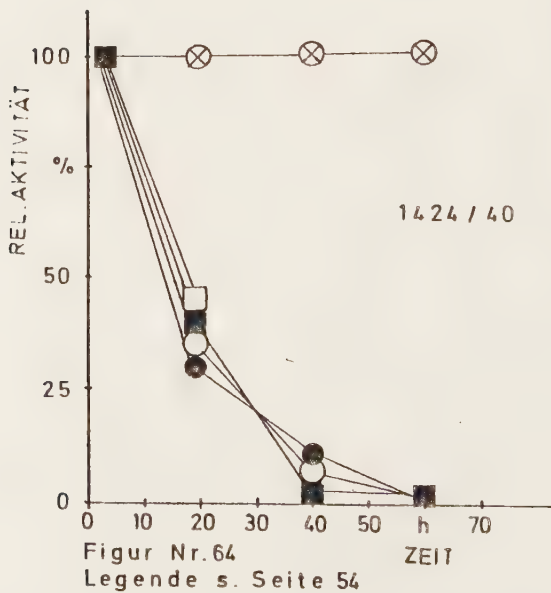
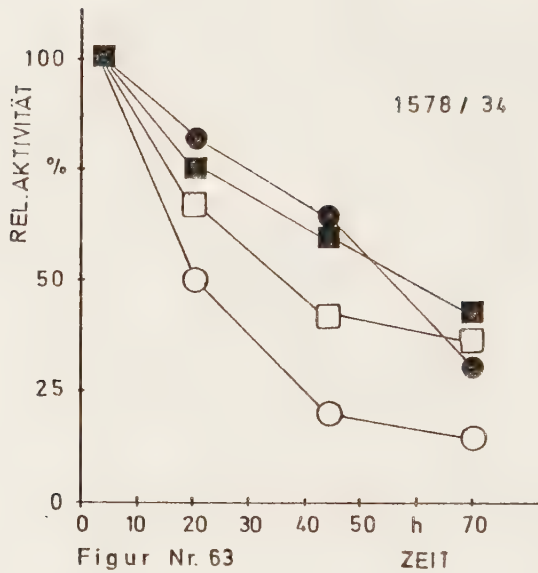


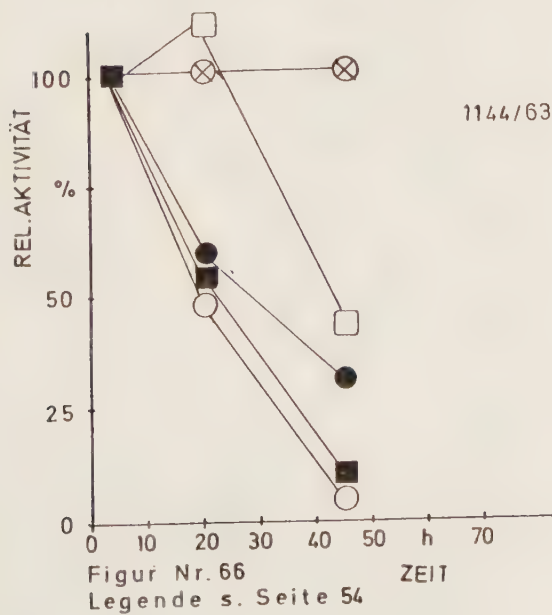
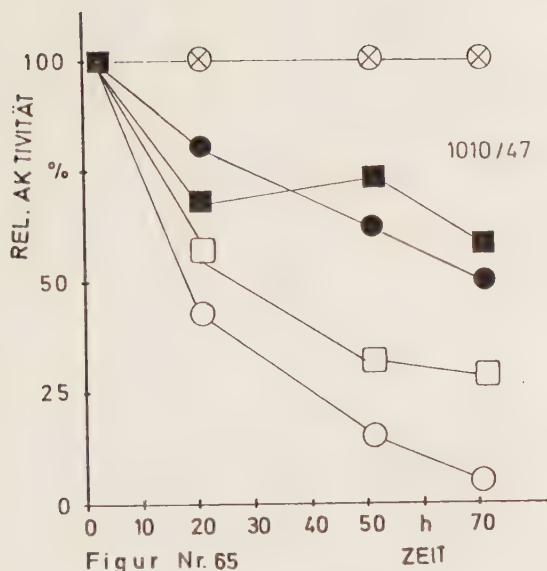


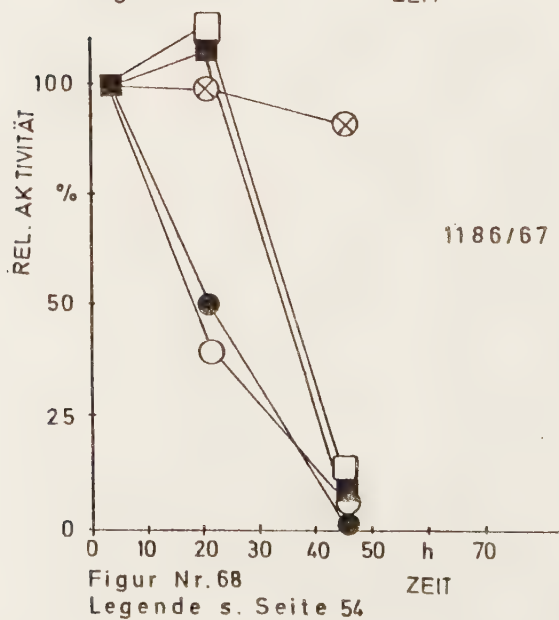
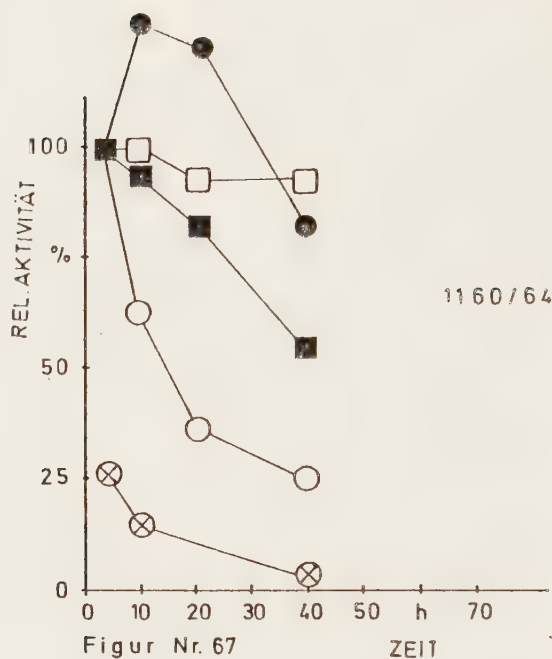


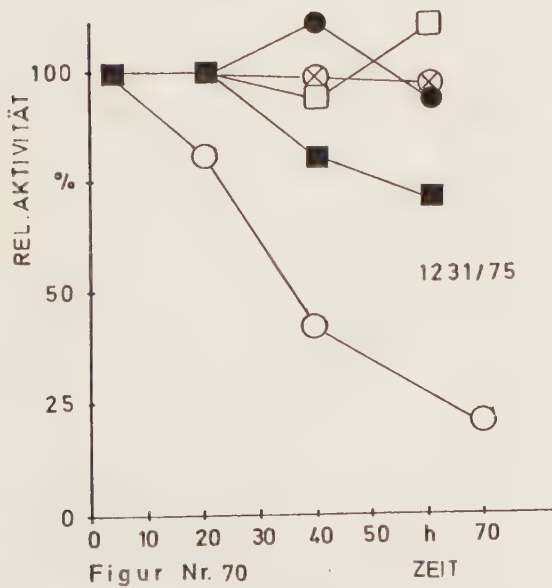
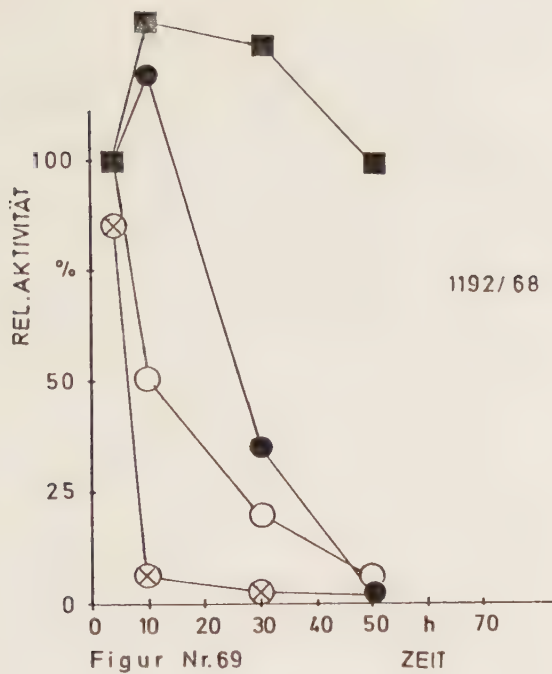




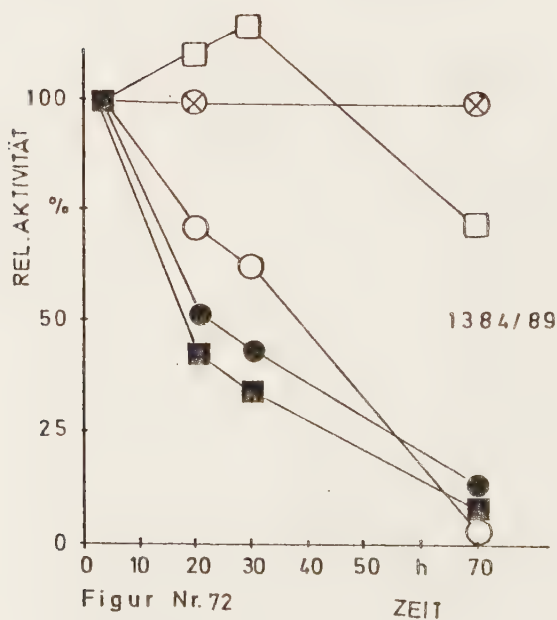
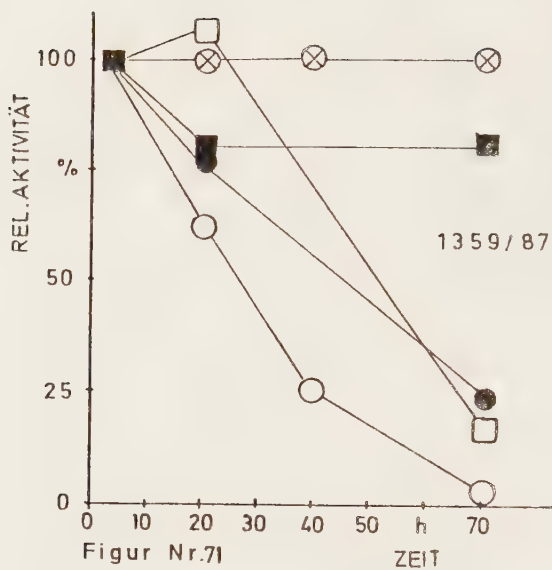


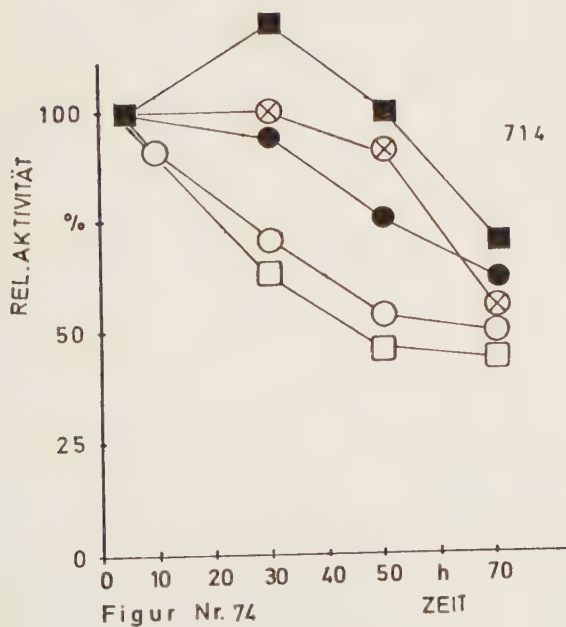
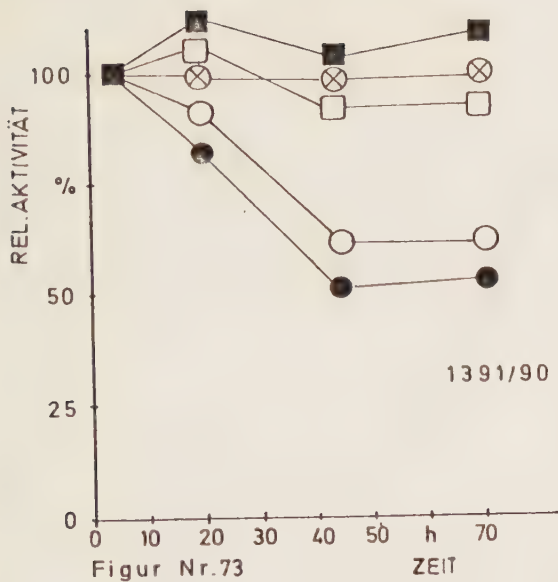




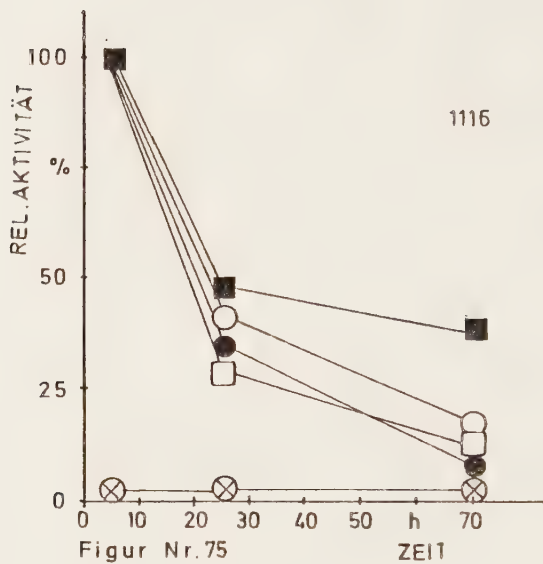


Legende s. Seite 54





Legende s. Seite 54



Figur Nr. 75

Legende s. Seite 54



Fig. 76

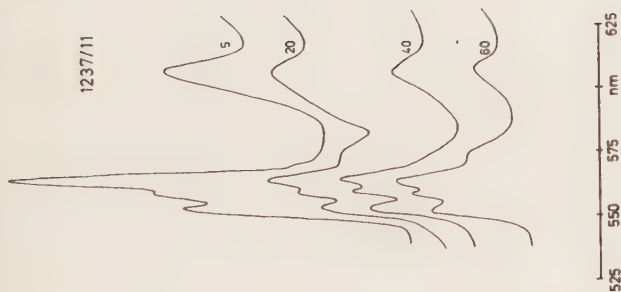


Fig. 77



Fig. 78

Fig. 76-96: Tieftemperatur-Cytochrom-Spektren von pet-ts-Mutanten nach unterschiedlich langer Kultivation im Chemostaten bei nicht-permissiver Temperatur

Experimentelle Einzelheiten s. Material und Methoden



Fig. 79



Fig. 80



Fig. 81



Fig. 84



Fig. 83



Fig. 82



Fig. 85



Fig. 86



Fig. 87

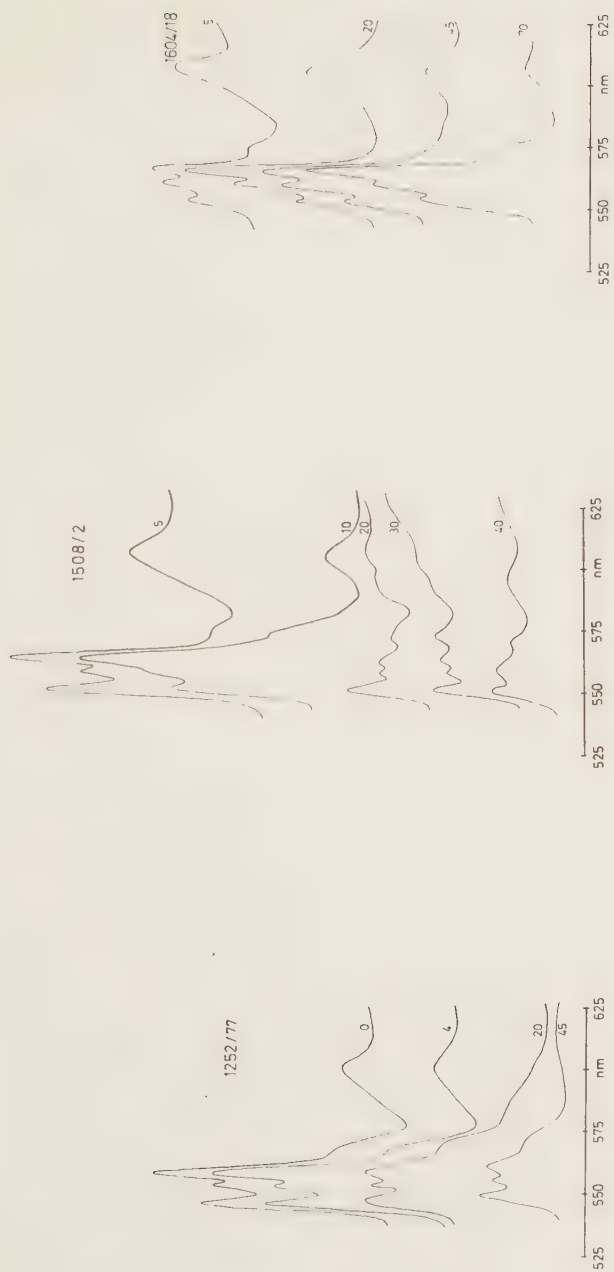


Fig. 88

Fig. 89

Fig. 90



Fig. 91



Fig. 92



Fig. 93



Fig. 96

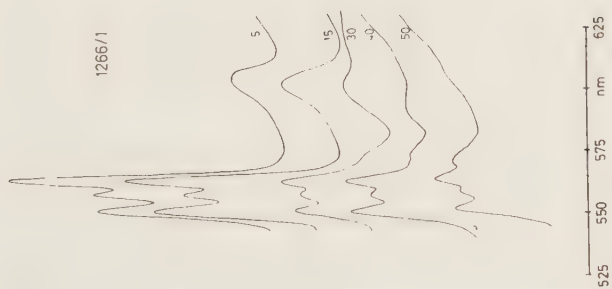


Fig. 95

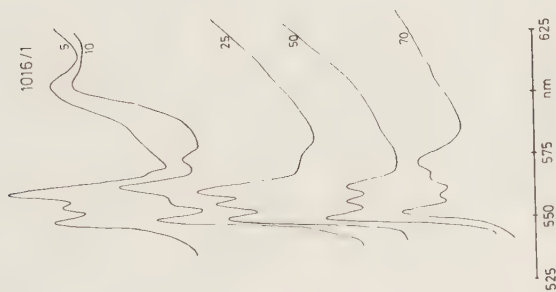


Fig. 94

2. Die Mutanten einer weiteren Gruppe (Gr. 11) zeigten einen spezifischen Defekt in der NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase. Aus Fig. 25-27 geht hervor, daß hier die beiden anderen getesteten Enzymaktivitäten, Cytochrom c Oxidase und ATPase, voll erhalten geblieben waren. Eine der drei untersuchten Mutanten (ts-1524) verlor innerhalb des Untersuchungszeitraumes auch ihren ρ^+ -Charakter. Wie auch in der Tab. 1 zugrunde liegenden Versuchsreihe beobachtet wurde, ist der ρ^+ -Charakter in den Mutanten dieser Gruppe nicht stabil und kann unter nicht-permissiven Bedingungen in einigen Fällen verloren gehen.

In Übereinstimmung mit diesen enzymatischen Befunden zeigten die Tieftemperaturspektren der Mutanten ts-267 (Fig. 77) und ts-1237 (Fig. 78) beim Übergang von permissiven zu nicht-permissiven Bedingungen eine deutliche und spezifische Abnahme der Cytochrom b-Bande bei 560 nm. Gleichzeitig damit trat bei ca. 575 nm eine neue Bande in Form einer Schulter auf der längerwelligen Seite der Cytochrom b-Bande auf. Es könnte sich hierbei um ein ähnliches Phänomen handeln, wie es weiter oben schon bei den Cytochrom c Oxidase-Mutanten der Gr. 4 beschrieben wurde. Überraschenderweise zeigten die daraufhin untersuchten Mutanten der Gruppe 11 auch schon bei 22°C eine gegenüber Wildtyp-Zellen stark verringerte Cytochrom c-Absorptionsbande (vgl. Fig. 77). Dieser Effekt dürfte im Zusammenhang mit einer wechselseitigen Beeinflussung der verschiedenen Cytochrome hinsichtlich ihrer Synthese von Interesse sein. Für die Atmungsdefizienz der Mutanten der Gruppe 11 ist er jedoch offensichtlich nicht von Bedeutung.

3. Die Mutante ts-1438, ein Vertreter der Komplementationsgruppe 19, wurde zwar unter nicht-permissiven Bedingungen Atmungs-defizient, verlor jedoch dabei keines der untersuchten Enzyme aus Atmungskette und ATP-Synthese (Fig. 28-29). Während die Atmungsrate nach 20 Stunden nur noch 10 bzw. 20 % des Ausgangswertes betrug, erfuhren die drei getesteten Enzymaktivitäten erst nach über 50 Stunden eine Verringerung auf 75 % des Ausgangswertes. Da sowohl beim Test auf Cytochrom c Oxidase wie auch bei dem auf NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-Aktivität freies Cytochrom c der Testmischung zugesetzt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß das endogen vorhandene Cytochrom c enzymatisch inaktiv war. Das nahezu Wildtyp-artige Cytochrom-Spektrum der Mutante ts-1438 liefert hierfür allerdings keinen Anhaltspunkt, schließt diese Möglichkeit aber auch nicht aus. Da die in Fig.79 aufgeführten Atmungs-raten mit dem Kulturgefäß direkt entnommenen Proben durchgeführt wurden, können grundsätzlich Defekte innerhalb der Glykolysekette oder des Trikarbonsäure-Zyklus zum phänotypischen Verlust der Zellatmung führen, ohne daß ein Glied des oxidativen Phosphorylierungs-Systems im engeren Sinne betroffen sein muß. Eine solche Möglichkeit wurde hier im einzelnen nicht weiter untersucht.
4. Neben den genannten Mutanten mit spezifischer Schädigung einer bestimmten enzymatischen Einzelkomponente wurden auch eine ganze Reihe von pet-Komplementationsgruppen charakterisiert, deren Vertreter beim Übergang von 22°C zu 36°C mehrere Funktionen gleichzeitig verloren. So verloren z.B. die Mutanten der Gruppen 2, 18, 22, 41, 43, 48, 49, 88, sowie die Mutanten ts-682 und ts-1242 (Fig. 30-40) sowohl Cytochrom c Oxidase-

wie NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-Aktivität, behielten jedoch die ATPase-Aktivität bei. Dabei vollzog sich der Verlust der beiden genannten Aktivitäten entweder völlig gleichzeitig (z.B. ts-1583, ts-1426 und ts-1365; Fig. 31, 41 und 88) oder die Inaktivierung war sequentiell, wobei der Verlust der Cytochrom c Oxidase-Aktivität vor der Inaktivierung der NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase häufiger beobachtet wurde als die umgekehrte Reihenfolge. Die geringe Zahl zur Verfügung stehender Vertreter der einzelnen Komplementationsgruppen erlaubt noch keine Aussage darüber, ob diese kinetische Unterschiede Komplementationsgruppen-spezifisch sind. Zweifellos muß diese unter dem Aspekt einer koordiniert-kontrollierten Synthese der Atmungsketten-Komponenten relevante Frage in künftigen Versuchen geklärt werden.

Wie schon bei den Mutanten des zuvor geschilderten Phänotyps geht auch hier bei einigen, aber nicht allen Stämmen mit dem Verlust einer karyotisch determinierten Atmung ein Übergang in den rho⁻-Zustand einher. Interessanterweise bleibt in den in diesem Abschnitt geschilderten Mutanten die ATPase-Aktivität in den dabei entstehenden rho⁻-Partikeln erhalten (vgl. ts-1508, Fig. 30).

Auch bei einigen Vertretern des in diesem Abschnitt geschilderten Phänotyps wurden die spektralen Veränderungen beim Übergang in den Mutantenzustand gemessen. Hierbei ist bei allen untersuchten Mutanten am auffälligsten das allmähliche Verschwinden der Cytochrom a-Bande bei 603 nm, welches wiederum oft von dem Auftreten einer neuen Absorptionsbande bei ca. 585 nm begleitet ist. Bei einer Mutante (ts-1508, Fig. 30) wird eine gleichmäßige Abnahme aller Cytochrome unter gleichzeitiger Ausbildung mehrerer neuer

Absorptionsmaxima beobachtet. Diese Pleiotropie steht sicher in Zusammenhang mit dem für diese Mutante charakteristischen Übergang bei 36°C in den $\underline{\rho}^-$ -Zustand.

5. Eine besonders große Zahl der in dieser Arbeit untersuchten karyotischen pet-Mutanten besitzt einen Phänotyp, welcher durch den nahezu gleichzeitigen Ausfall aller drei untersuchten Enzyme, der Cytochrom c Oxidase der NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase und der ATPase, gekennzeichnet ist. Es handelt sich hierbei um die Mutanten der Komplementationsgruppen 3, 8, 9, 23, 24, 25, 30, 34, 40, 47, 63, 64, 67, 68, 75, 87, 89, 90 und ts-714 und ts-1116 (vgl. Fig. 46-75). Es erscheint möglich, daß in manchen Fällen diese Pleiotropie eine Folge des Verlusts von funktioneller mitochondrieller DNA darstellt (gleichzeitiger Übergang aller Zellen vom $\underline{\rho}^+$ - in den $\underline{\rho}^-$ -Zustand).

In anderen Fällen, - vor allem solchen, bei denen eine Verzögerung zwischen dem Verlust der Enzymaktivitäten und dem des $\underline{\rho}^+$ -Charakters beobachtet wurde (z.B. ts-1371 und ts-1396) - mögen beides, der Verlust der Enzymaktivitäten und einer funktionsfähigen mitochondriellen DNA, voneinander unabhängige Vorgänge sein. Zumindest diejenigen Mutanten, welche trotz des eindeutigen Verlustes aller drei Enzym-Aktivitäten ihren $\underline{\rho}^+$ -Charakter behalten (z.B. ts-1414, ts-1187, ts-1527 und ts-1424, Fig. 51, 58, 61, 64) beweisen jedoch, daß das Auftreten dieses pleiotropen Enzymaktivitäts-Verlustes nicht immer in kausalem Zusammenhang mit dem Verlust funktionsfähiger mitochondrieller DNA gesehen werden muß.

Die Tieftemperaturspektren von ausgewählten Mutanten der verschiedenen hier erwähnten Komplementationsgruppen erbrachten folgende Resultate: die Mutante ts-1414 (Fig. 80) z.B. verlor sehr schnell Cytochrom a gefolgt von den anderen Cytochromen. Dabei entwickelte sich wieder eine "Schulter" bei 575 nm. Bei den Mutanten der Gruppe 8 (z.B. ts-1371 und ts-1396, Fig. 81 - 82) fällt insbesondere die spezifische Abnahme der Cytochrom a- und Cytochrom b-Banden auf. Danach wurde auch die Intensität der Cytochrom c- und Cytochrom c₁-Banden deutlich verringert. Eine bei allen in diesem Abschnitt besprochenen Mutanten beobachtete Eigenschaft war die letztlich generell abnehmende Absorptionsintensität aller Cytochrom-Banden. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei den Mutanten ts-1156, ts-1260 und ts-9 (Fig. 83 , 84, 85).

6. Eine gewisse Sonderstellung nehmen die Mutanten der Komplementationsgruppe 1 ein. Wie schon aus Tab. 1 und, noch deutlicher, aus Fig. 41-49 hervorgeht, ist diese Gruppe recht heterogen aus Vertretern fast aller oben erwähnter biochemischer Phänotypen zusammengesetzt. So findet man hier Mutanten, welche rasch und spezifisch eine Cytochrom c Oxidase-Defizienz entwickeln (z.B. ts-1016, Fig. 42) neben anderen, die Cytochrom c Oxidase-Aktivität, NADH-Cytochrom c Reduktase-Aktivität und ρ^+ -Charakter verloren (z.B. ts-321) so wie anderen, welche Cytochrom c Oxidase-, NADH Cytochrom c Oxidoreduktase-, ATPase und ρ^+ -Charakter verlieren z.B. ts-1147 und ts-1513. Auch Mutanten mit einem Verlust der genannten Enzymaktivitäten unter Erhaltung des ρ^+ -Charakters traten gelegentlich auf (vgl. ts-1266, Fig. 45). Schließlich wurde auch bei einer Mutante (ts-1296, Fig. 47) ein sonst nicht beobachtetes Defektmuster gefunden, nämlich der Ver-

lust von Cytochrom c Oxidase- und ATPase-Aktivität unter Erhaltung der NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-Aktivität.

In guter Übereinstimmung mit den verschiedenen erwähnten biochemischen Defekten stehen die spektralen Eigenschaften der entsprechenden Mutanten. So kam es bei ts-321 (CytochromcOxidase, NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-Verlust) erst zu einem Verlust der Cytochrom a-Bande, gefolgt von dem Verschwinden der Cytochrom b-Bande (Fig. 93). Bei ts-1o16 (Cytochrom c Oxidase-Defekt) verschwand zuerst Cytochrom a, während die Cytochrom b-Bande durch einen neu entstandenen Gipfel mit einem Maximum bei 575 nm fast überdeckt wurde (Fig. 94). Bei der Mutante ts-1513 (Cytochrom c Oxidase, NADH-Cytochrom c Reduktase, ATPase-Defekt, ρ^- -Zustand, Fig. 96) waren schon zu Beginn der Temperaturerhöhung zwei Schultern vorhanden, die zwischen Cytochrom a und Cytochrom b lagen, die im Falle von Cytochrom b erst verstärkt wurden dann aber beide verschwanden, bzw. zurückgingen.

3. Anzucht von ausgewählten pet-ts-Mutanten im Chemostaten unter Verwendung eines automatischen Probennehmers und Entwicklung einer Anordnung zur automatischen Konstanthaltung der Zelldichte.

Trotz der deutlichen und weiter oben im einzelnen beschriebenen Vorteile einer Chemostaten-Kultur gegenüber der diskontinuierlichen Anzucht von temperatursensitiven Mutanten waren einige methodische Schwierigkeiten bei der anfänglich benutzten Apparatur nicht zu übersehen:

- a) Es war nicht immer ganz einfach, besonders beim Übergang von 22°C auf 36°C sowie im Verlauf langer Kultivationsperioden, die Zellzahl durch manuelles Verändern der Nährmittelzufuhr konstant zu halten.
- b) Zur Entnahme von Proben mußte der bei 100 ml Ansätzen als Kulturgefäß fungierende Erlenmeyerkolben zu wiederholten Malen geöffnet werden, wobei immer die Gefahr einer Kontamination der Kultur durch unerwünschte Mikroorganismen bestand. Dadurch wurde die Verwendung von Minimal-Medium praktisch unumgänglich, da entsprechende Versuche mit einem, für das Wachstum der Mutanten an sich viel besser geeigneten, Vollmedium keine befriedigende Resultate lieferte. Um diese Schwierigkeiten auszuschalten wurden von mir die in Material und Methoden, Abs. 17 und 18 beschriebenen Apparate entwickelt. Es handelte sich dabei einmal um eine Apparatur zur Konstanthaltung der Zelldichte und zum anderen um einen automatischen Probennehmer. Durch die Verwendung dieser beiden Vorrichtungen gelang es, die Zelldichte innerhalb extrem geringer Toleranzen konstant zu halten und eine Kontamination vollständig auszuschließen.

Ben, da nach der sterilen Überführung des Inokulums der Kolben nicht mehr geöffnet zu werden brauchte. Die erfolgreiche Anwendung dieser Zusatzgeräte für die Konstanthaltung der Zelldichte einer Kultur während des ganzen Versuchszeitraumes ist in Fig. 98 und 99 verdeutlicht. In Fig. 98 wurde der Wildtyp-Hefestamm SC-9 in MIN-Medium bis zu einer Zelldichte von 100 Klett-Einheiten (entsprechend spätlog. Wachstumsphase) angezogen und dann die automatische Zelldichte-Regelung in Betrieb genommen. Diese Regelung war so eingestellt, daß bei Erreichen eines oberen Schwellwertes die Nährlösungs-Pumpe aktiviert wurde. Die Pumpe schaltete sich erst wieder aus, wenn die Zelldichte auf Grund des Zupumpens frischer Nährlösung auf einen vorgegebenen unteren Schwellwert abgesunken war (Pfeile in Fig. 98). Fig. 98 zeigt die zeitliche Veränderung der Zelldichte im Verlauf einer Vielzahl derartiger aufeinanderfolgender Zyklen von Nährmittelzupumpen und Nachwachsen der Kultur. Wie Trübungsmessungen am oberen und unteren Schwellwert zeigten, entsprach die Zelldichte der Kultur hierbei Absorptionswerten von 101 bzw. 99 Klett-Einheiten. Demnach ist die Zelldichte einer solchen Kultur innerhalb eines Schwankungsbereiches von maximal 2 % konstant.

Wie schon in Material und Methoden erwähnt wurde, kann aus der Steigung des Schreiberdiagramms in Fig. 98 direkt die Wachstumsrate der Kultur unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen abgeleitet werden. So wurden z.B. in dem in Fig. 98 dargestellten Versuch die Temperaturabhängigkeit der Wachstumsrate einer Saccharomyces cerevisiae Wildtyp-Kultur bestimmt, indem während des dargestellten

Versuchszeitraumes die Temperatur des Kulturgefäßes, unter sonst gleichbleibenden äußeren Bedingungen, kontinuierlich von 20°C auf 45°C erhöht wurde. In Fig. 100 sind die dabei für bestimmte Temperaturen aus dem Diagramm in Fig. 98 abgeleiteten Wachstumsraten aufgetragen. Man sieht, daß das Temperatur-Optimum dieser Kultur bei 30°C liegt.

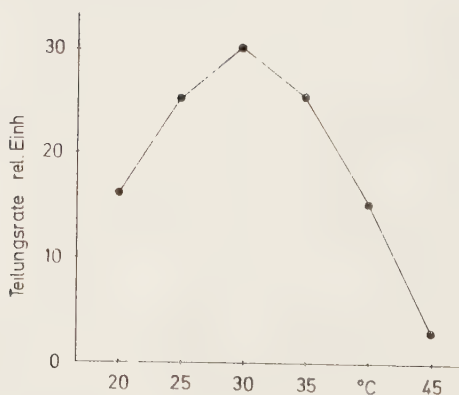


Fig. 97: Wachstumsraten von *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp-Zellen in Abhängigkeit von der Temperatur

Die in dieser Figur aufgeführten Werte wurden dem Schreiberdiagramm in Fig. 98 entnommen.

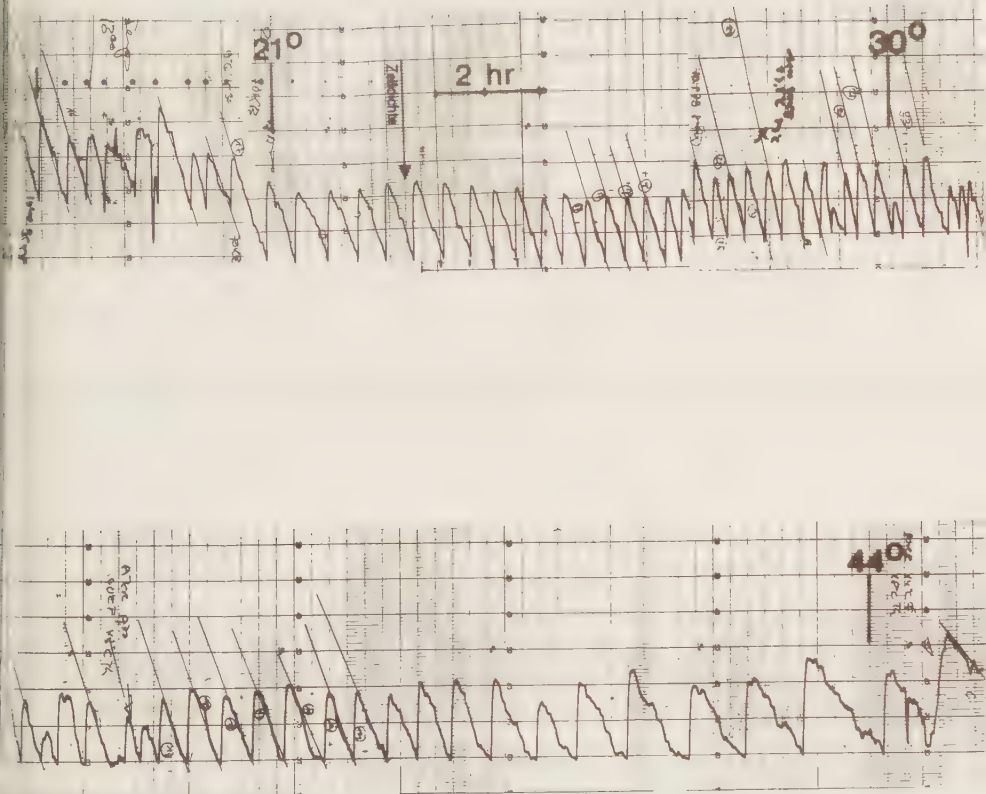


Fig. 98: Zelldichte-Diagramm einer *Saccharomyces cerevisiae* Wildtyp-Kultur im Verlauf einer Kultivation bei kontinuierlich ansteigender Temperatur.

Die Zelldichte der Chemostat-Kultur wurde automatisch konstant gehalten.

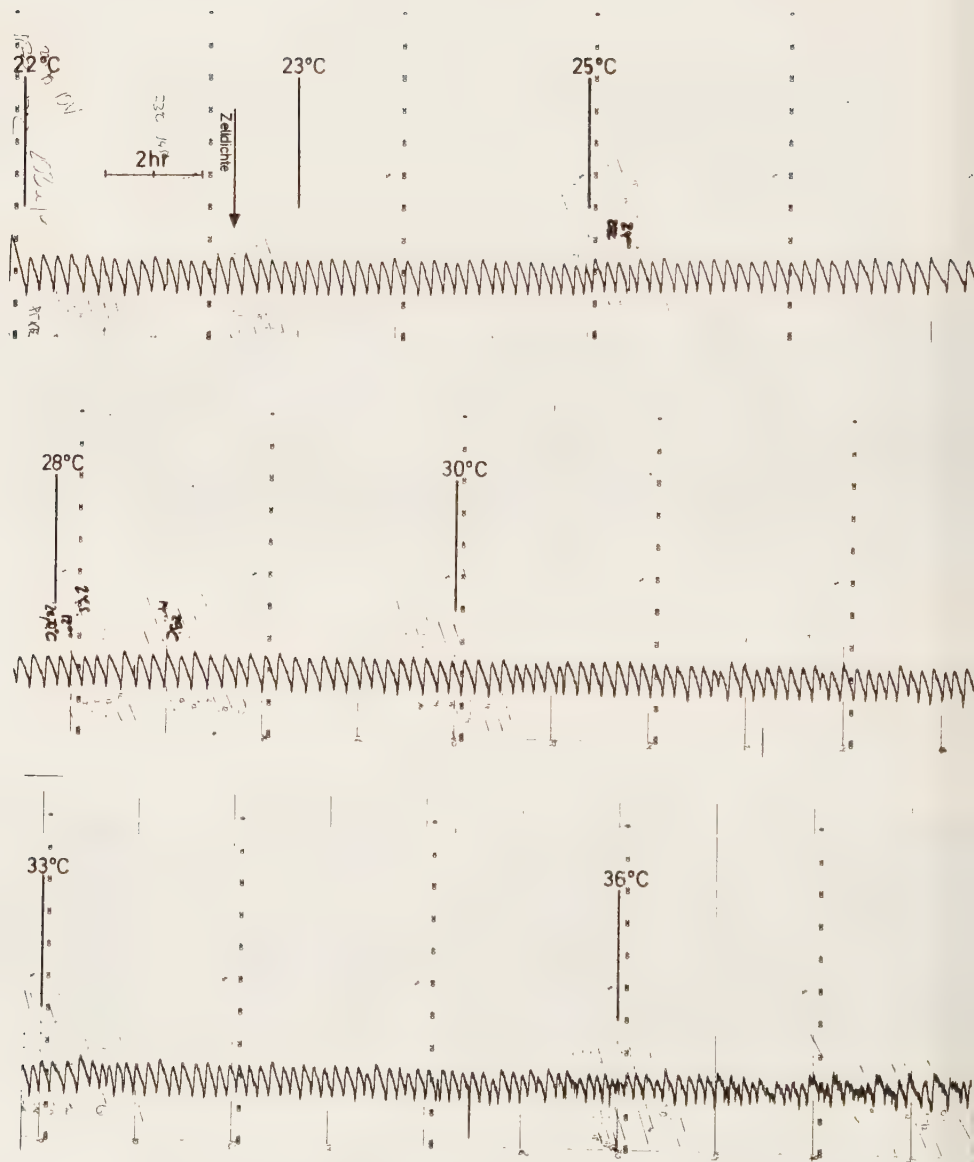


Fig. 99: Zelldichte-Diagramm einer pet-ts-Mutanten-Kultur (ts-203) im Verlauf einer Kultivierung bei kontinuierlich ansteigender Temperatur

Die Zelldichte der Chemostat-Kultur wurde automatisch konstant gehalten.

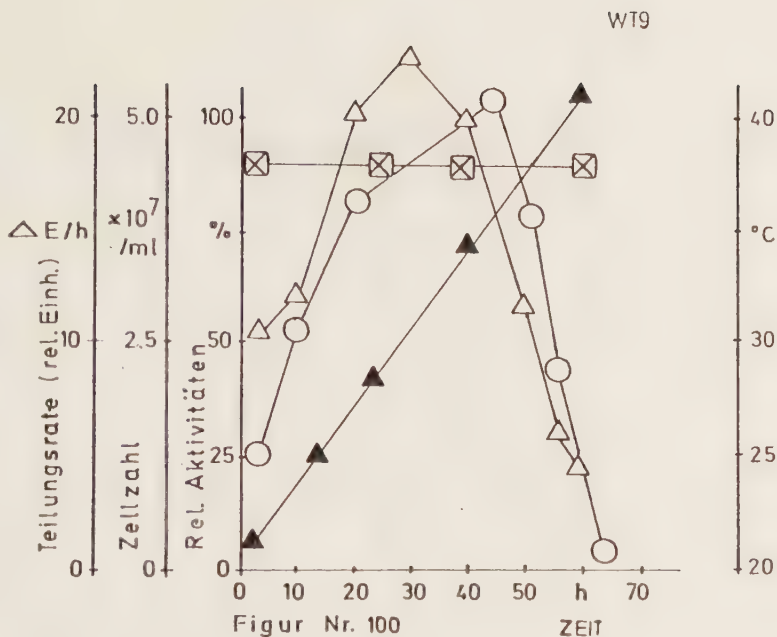
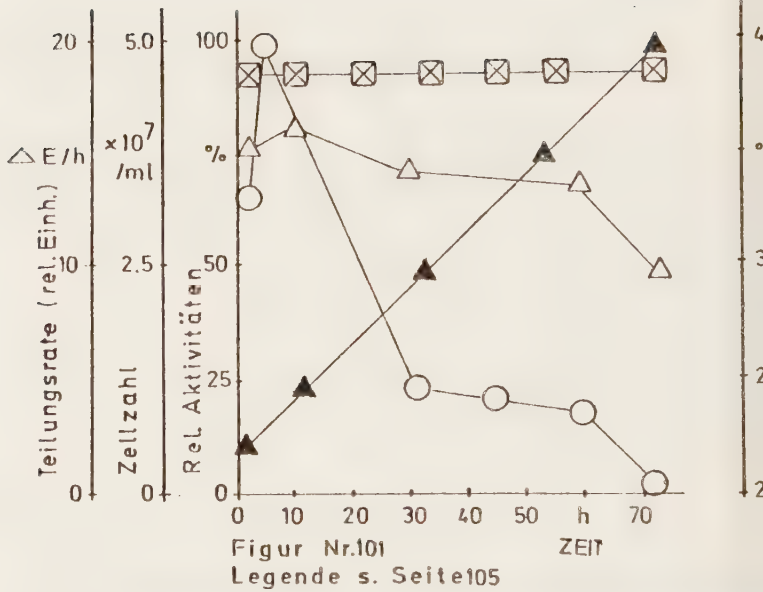


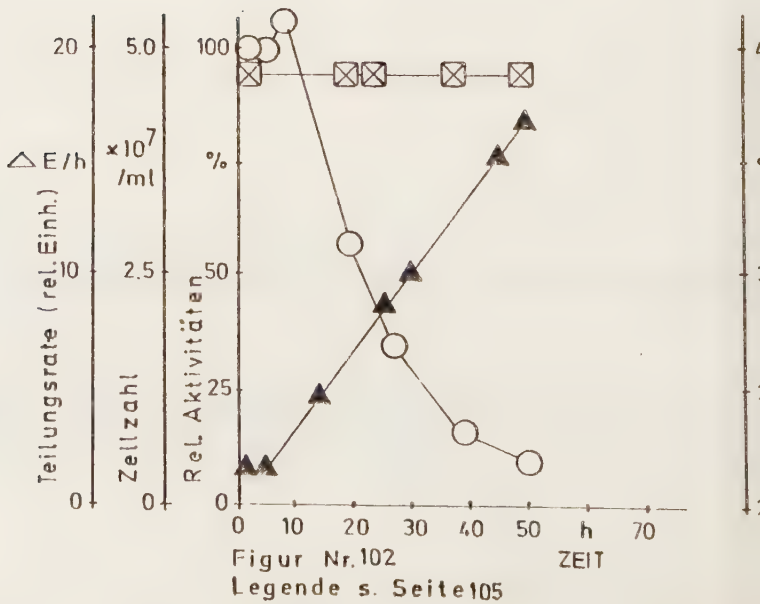
Fig. 100-103: Wachstumsraten und Sauerstoffverbrauch von Wildtyp-Zellen und pet-ts-Mutanten im Verlauf einer Kultivierung bei kontinuierlich ansteigender Temperatur

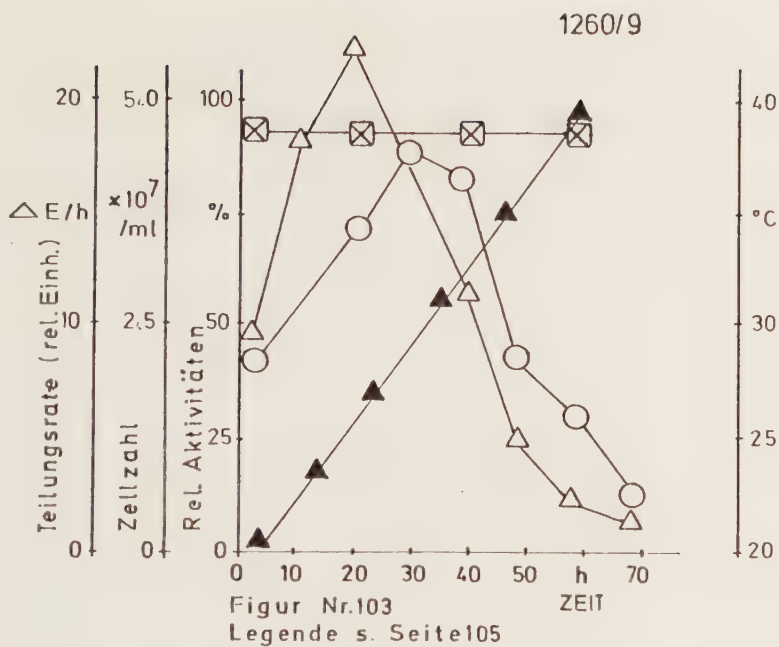
Die Zellzahl (⊗) wurde während der gesamten Versuchsdauer konstant gehalten. Die Temperatur (▲) stieg im Versuchszeitraum linear an. Wachstumsraten (Δ) und Sauerstoffverbrauch (●) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

203/4



1336/ 4





Entsprechende Experimente wurden auch mit einer Reihe von temperatursensitiven pet-Mutanten durchgeführt. Dabei wurden in allen Fällen Atmungsrate und Zelldichte der Kultur als Funktion der innerhalb des Versuchszeitraums kontinuierlich von 22°C auf 40°C ansteigende Temperatur gemessen (Fig. 101-103). Zusätzlich wurde bei einigen Mutanten neben den genannten Parametern auch die mit ansteigender Temperatur sich ändernde Teilungsrate der Zellen bestimmt (Fig. 101-102). Diese Teilungsraten wurden ähnlich wie in dem oben geschilderten Experiment mit Wildtyp-Hefe, dem Diagramm des Zelldichteschreibers entnommen. Eines dieser Diagramme ist in Fig. 99 gezeigt. Fig. 100-103 ist zu entnehmen, daß in allen Kulturen als Folge der kontinuierlich ansteigenden Temperatur sowohl Atmungs- wie Teilungsraten zunächst anstiegen, und dann jenseits eines für jeden Stamm charakteristischen Temperatur-Optimums gewöhnlich bis auf einen Wert nahe Null absanken. Als einzige und bemerkenswerte Ausnahme hiervon stellte sich hinsichtlich der Temperaturabhängigkeit ihrer Teilungsrate die Mutante ts-203 dar. Wie aus Fig. 101 hervorgeht sinkt bei ihr, selbst bei einer Temperatur von 40°C, die Teilungsrate nur auf ca. 60 % des bei 22°C gemessenen Wertes ab.

Verglichen mit Wildtyp-Hefe sind die für Wachstum und Atmung optimalen Temperaturen bei allen untersuchten pet-ts-Mutanten deutlich, zum Teil sogar drastisch erniedrigt. Dieser Befund entspricht der Erwartung, daß das in einer temperatursensitiven Mutante enthaltene mutierte Protein sich von dem entsprechenden Wildtyp-Protein durch eine meist schon bei deutlich niedrigeren Temperaturen einsetzende thermische Denaturierung unterscheidet.

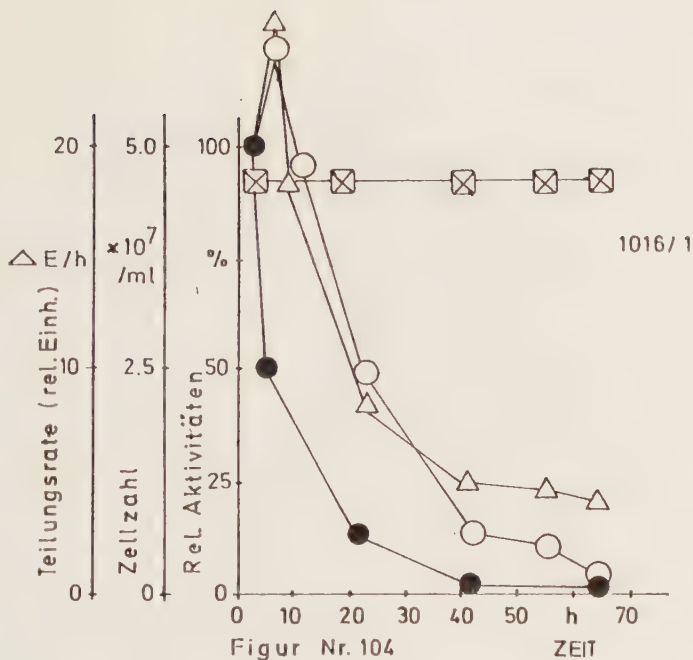
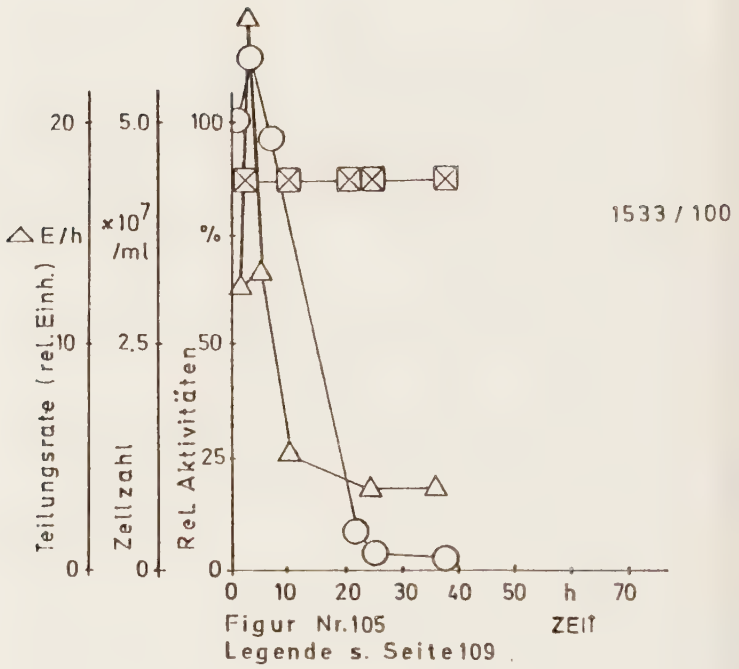


Fig. 104-105: Wachstumsraten und Sauerstoffverbrauch von pet-ts-Mutanten nach sprunghafter Erhöhung der Temperatur von 22°C auf 36°C zum Zeitpunkt Null.

Die Zellzahl wurde während der gesamten Versuchsdauer konstant gehalten. Wachstumsraten (Δ) und Sauerstoffverbrauch (O) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.



Nachdem es möglich geworden war, in Chemostat-Kulturen mit Hilfe der geschilderten Regelautomatik die Wachstumsraten von *ts*-Mutanten in Abhängigkeit von bestimmten Kultivations-Temperaturen zu bestimmen wurden einige pet-*ts*-Mutanten zunächst unter permissiver Bedingungen (22°C) kultiviert, dann die Temperatur unvermittelt auf 36°C erhöht und Atmungs- wie Wachstumsraten der Mutanten nach diesem Übergang zu nicht-permissiven Bedingungen zeitlich verfolgt. Während die Atmungsraten erwartungsgemäß und in Übereinstimmung mit den schon weiter oben geschilderten Versuchen alsbald auf Null absanken (Fig. 104-105), wäre es hinsichtlich der Teilungsraten denkbar gewesen, daß eine bestimmte Mutante in atmenden Zustand, d.h. bei 22°C , eine erste und hierfür charakteristische Teilungsrate besitzt, welche dann nach der Temperaturerhöhung auf 36°C allmählich auf einen niedrigeren, für den anaeroben Energiestoffwechsel typischen Wert absinkt. Beide Werte sollten, bei jeweils gleichbleibenden Temperaturen, grundsätzlich über längere Kultivationsperioden konstant bleiben. Fig. 104 scheint diese Annahme zu bestätigen, indem nach dem Verschwinden der Atmung die Teilungsraten der Mutanten auf einen wesentlich niedrigeren und, zumindest während des Versuchszeitraums, konstant bleibenden Wert absanken.

Der anfänglich in diesen wie auch anderen, vergleichbaren Diagrammen regelmäßig zu beobachtende Anstieg der Atmungs- und Teilungsraten innerhalb der ersten 5 Std. nach Temperatur-Erhöhung ist ein Befund, der im Moment noch nicht eindeutig erklärt werden kann. Da die Erwärmung der Kultur von 22°C auf 36°C sehr rasch erfolgte und schon nach wenigen Minuten abgeschlossen war, beruht dieser noch nach mehreren Stunden zu beobachtende Aktivierungs-Effekt sicher-

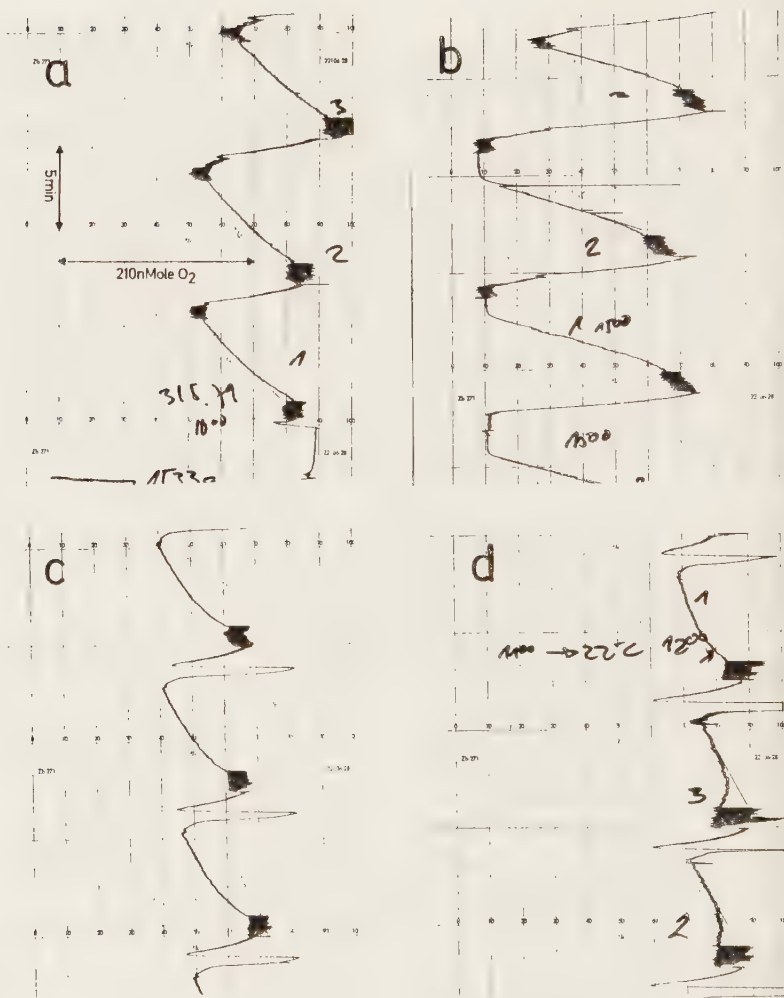


Fig. 106: Automatisch gemessene Atmungsraten einer pet-ts-Mutanten-Kultur (ts-1533) mit selbsttätig entnommenen Proben zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach sprunghafter Erhöhung der Temperatur von 22°C auf 36°C.

Bild a zeigt die Atmungsraten zum Zeitpunkt Null, Bild b, c und d zeigen die Atmungsraten der Mutanten-Kultur zu den Zeitpunkten 5 Std. 20 bzw. 50 Std. nach Erhöhung der Temperatur von 22°C auf 36°C zum Zeitpunkt Null. Es wurde die Mutante ts-1533 verwendet.

lich nicht auf der generell durch eine Temperaturerhöhung bewirkten Steigerung der Kinetik jeder chemischen Reaktion.

Außer der geschilderten Regelvorrichtung, welche eine konstante Zelldichte während der Kultivation von Hefezellen in Chemostaten gewährleistet, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine Apparatur entwickelt, die es ermöglicht, einem Fermenter automatisch und zu beliebig vorwählbaren Zeitpunkten Proben zu entnehmen. Neben der Verringerung des Arbeitsaufwandes besitzt eine solche Vorrichtung auch noch eine Reihe anderer Vorteile. So können z.B. Proben auch während der Nacht entnommen, automatisch gesammelt und dann am nächsten Tag zusammen weiterverarbeitet werden.

Die grundsätzliche Funktionsweise dieses automatischen Probennehmers wurde schon in Material und Methoden ausführlich beschrieben. Eine Gesamtansicht eines Fermenters, der mit diesem Zusatzgerät sowie mit der oben beschriebenen Meßzelle zur Zelldichte-Bestimmung ausgerüstet ist, vermittelt Fig. 10. Ein mit Hilfe dieser Automatik durchgeführtes Experiment ist in Fig. 106 wiedergegeben. Darin wurden die Atmungsraten einer pet-ts-Mutantenkultur zu verschiedenen Zeitpunkten nach der sprunghaften Erhöhung der Temperatur von 22°C (permissiv) auf 36°C (nicht-permissiv) gemessen. Das Ergebnis stimmt mit den manuell gemessenen und schon weiter oben näher beschriebenen Eigenschaften der untersuchten Mutante ts-1533 überein, es wurde jedoch im vorliegenden Experiment mit einem vergleichsweise wesentlich geringeren Arbeitsaufwand erhalten.



Fig. 107



Fig. 108

Fig. 107: Raumtemperaturspektren eines gereinigten Cytochrom c Oxidase-Präparates.

Es wurden je 3 ml einer Enzym-lsg. (0,13 mg/ml in 0,3 M NaP_i , pH 7, 1% Tween 80) mit Na-dithionit reduziert bzw. mit K-Hexacyanoferrat oxidiert und die Differenzspektren in einem DW 2 UV/VIS Spektrophotometer aufgenommen. Meßbereich: 400-630 nm, Spalt 1 nm, Schichtdicke: 1 cm. Es bedeutet: --- red/ H_2O , -.-.red/ox, — ox/ H_2O .

Fig 108: SDS-Gelelektrophorese-Muster eines gereinigten Cytochrom c Oxidase-Präparates.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

4. Immunologische Untersuchung von Cytochrom c Oxidase defekten pet-Mutanten

Schließlich soll noch über eine vorbereitende Arbeit zu Untersuchungen berichtet werden, welche letztlich die Frage beantworten sollen, welche Cytochrom c Oxidase-Untereinheiten in den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Cytochrom a-defizienten Stämmen nicht mehr synthetisiert werden. Dabei war zunächst an Immunpräzipitations-Versuche mit spezifischem Cytochrom c Oxidase-Antiserum und anschließende gelelektrophoretische Charakterisierung des präzipitierten kreuzreagierenden Materials (CRM) gedacht.

Zu diesem Zweck wurde zunächst das Enzym Cytochrom c-Oxidase aus Wildtyp-Mitochondrien nach der Methode von SCHATZ gereinigt (vgl. Material und Methoden). Das Raumtemperatur-Spektrum des gereinigten Enzympräparates ist in Fig. 107, die gelelektrophoretische Auftrennung des mit SDS dissoziierten Enzyms in Fig. 108 gezeigt. Demnach ist spektral keine Verunreinigung durch andere Cytochrome feststellbar und das SDS-Polyacrylamid-Bandenmuster gleicht dem von TZAGOLOFF veröffentlichten Bild (54).

Mit diesem Cytochrom c Oxidase-Präparat wurde ein Kaninchen immunisiert und mit dem dabei gewonnenen Antiserum die Rohextrakte verschiedener pet-ts-Mutanten nach Anzucht bei 36°C im Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY (49) untersucht. Die dabei erzielten qualitativen Ergebnisse sind in Tab. 2 wiedergegeben. Demnach enthalten alle Mutanten der Komplementationsgruppe 4, welche sich bei spektraler wie auch enzymatischer Charakterisierung als spezifisch Cytochrom a bzw. Cytochrom c Oxidase-defizient erwiesen hatten

Tabelle 2: Immunologische Untersuchung Cytochrom c Oxidase defekter pet-ts-Mutanten

In der ersten Spalte ist die Mutantennummer, in der zweiten die Komplementationsgruppennummer und in der dritten Spalte die Immunreaktion gegenüber Wildtyp-Antiserum dargestellt. Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

ts-Mutante	Gruppe	Immun.-Reaktion
1016	1	+
1583	2	-
1596	3	-
413		-
1094		-
1414		-
1098		-
203	4	+
1202		+
634		+
108		+
17		+
1336		+
1575		+
1541		+
106		+
1023	8	-
1325		-
320	9	-
1156		-
1260		-
1274	22	-
1107	34	-
1391	90	-
1533	100	+
1590	105	-

noch eindeutig mit dem verwendeten Antiserum präzipitierbares kreuzreagierendes Material. Ob dieses allerdings noch alle Komponenten des Wildtyp-Enzyms in qualitativ und quantitativ vergleichbarer Form enthielt, konnte durch diesen Test nicht entschieden werden. Diese Frage wurde in der vorliegenden Arbeit auch nicht weiter untersucht. Viele der in entsprechender Weise untersuchten Vertreter anderer pet-Komplementationsgruppen enthielten demgegenüber kein Cytochrom c Oxidase-CRM mehr. Dies war insofern kein überraschender Befund, als es sich hierbei ausnahmslos um biochemisch pleiotrope, oft sogar noch zusätzlich rho⁻-gewordene Mutanten handelte.

IV. DISKUSSION

Bei Temperatur-sensitiven Mutanten kann durchaus nicht generell damit gerechnet werden, daß beim Erwärmen der zuvor bei permissiver Temperatur gewachsenen Zellen auf nicht-permissive Temperatur sich sofort der Mutanten-Charakter ausprägt. Dies wird nur in solchen Fällen eintreten, wo sich das betreffende, zu Temperatursensitivität mutierte Protein auch im Reagenzglas durch einfaches Erwärmen auf 36°C inaktivieren läßt. Erfahrungsgemäß war dies jedoch bisher nur bei wenigen ts-Enzymen möglich. So ist bei vielen mutierten Proteinen offenbar nur die naszierende Polypeptidkette, jedoch nicht mehr das fertige Produkt temperatur-empfindlich (55). Dieses unerwartete Verhalten mag durch eine Stabilisierung der biologisch aktiven Tertiärstruktur durch Einbau der betreffenden Polypeptidkette in multimere oder membranöse Strukturen bedingt sein. Speziell bei den aus einer größeren Zahl von Untereinheiten bestehenden, Membran-integrierten Enzymen der mitochondriellen Atmungskette verwundert es demnach nicht, daß alle bisher diesbezüglich untersuchten ts-Mutanten nur durch eine über mehrere Generationen andauernde Kultivation bei 36°C inaktiviert werden. Es wurde gefunden, daß gewöhnlich nach 4-5 Zellteilungen die Zellatmung aufgehört hatte, was mit einem durch einfaches "Ausverdünnen" bedingten Absinken der ursprünglich vorhandenen, aktiven Enzymmoleküle auf ca. 3 % des Ausgangswertes am einfachsten erklärt werden kann (U. Holner, Dissertation Erlangen, 1978). Daher wurden, um den Inaktivierungsprozeß möglichst übersichtlich und einfach diskutierbar zu halten, in dieser Arbeit generell mit Chemostat-Kulturen gearbeitet, bei denen die Inkubationstemperatur als einziger Kultivations-Parameter variiert

wurde. Die dabei entwickelten und hier beschriebenen technischen Verbesserungen führten zu deutlichen Erleichterungen in der Handhabung und einer Steigung der Aussagekraft dieser Methode.

Eine grobe Überschlagsrechnung ergibt, daß an der Synthese eines vollständigen, funktionsfähigen Mitochondrions mindestens 500 verschiedene Struktur-Gene beteiligt sein müssen. Inzwischen sind in diesem Institut ca. 5.000 verschiedene pet-Mutanten isoliert und ca. 400-500 verschiedenen Komplementations-Gruppen zugeordnet worden. Für die hier geschilderten Untersuchungen standen seinerzeit jedoch nur ca. 200 Mutanten aus 106 verschiedenen Komplementationsgruppen zur Verfügung. Quantitativ endgültige Gen-Enzym Relationen konnten daher mit einer solchen geringen Zahl von Mutanten von vornherein nicht erwartet werden.

Die Enzyme Cytochrom c Oxidase, ATPase und NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase, auf welche bei der biochemischen Charakterisierung der in dieser Arbeit verwandten Mutanten das Hauptaugenmerk gerichtet wurde, sind jedes für sich heterogen zusammengesetzte Komplexe mit bis zu 16 verschiedenen Protein-Untereinheiten (5). Auch wenn man berücksichtigt, daß bei allen 3 Komplexen einige der Untereinheiten durch die Mitochondrien-DNA kodiert werden (56), so fällt doch auf, daß nur für die Cytochrom c Oxidase eine der erwarteten Genzahl in etwa entsprechende Anzahl von spezifischen Cytochrom a-defekter Komplementations-Gruppen gefunden wurde. Demgegenüber wurde nur eine einzige NADH-Cytochrom c-defiziente und überhaupt keine spezifische ATPase defekte Mutanten-Gruppe gefunden. Abgesehen von der naheliegenden Erklärung, daß einfach eine zu geringe Anzahl von Mutanten untersucht wurde, könnte in diesem Befund jedoch auch eine Eigenschaft zum Ausdruck kommen, die offenbar für eine ganze Reihe von Proteinen der in-

neren Mitochondrien-Membran charakteristisch ist: daß nämlich eine durch Mutationen hervorgerufene Konformationsänderung nicht nur zur enzymatischen Inaktivierung des direkt betroffenen Proteins oder zum Ausfall seiner Integration in die Mitochondrien-Membran, oder zur Hemmung seiner Synthese, oder zu einer Steigerung seiner Abbaurate durch Proteolyse führt, sondern daß einer oder mehrere der eben genannten Effekte sich auch auf die Aktivität, Synthese oder Membraninkorporation anderer Proteine der Mitochondrien-Membran auswirkt. Dann wäre eine mehr oder weniger weitgehende Pleiotropie biochemischer Defekte im Phänotyp einer solchen Mutation die unumgängliche Folge des Primärdefektes. Die in dieser Arbeit wie auch von anderen Autoren oft beobachteten pleiotrop defekten pet-Mutanten sind ein deutlicher Hinweis auf die Berechtigung einer solchen Annahme (57).

Wie schon eingangs erwähnt, waren in dieser Arbeit, speziell in Anbetracht des pleiotrop defekten Phänotyps vieler pet-Mutanten ausschließlich Temperatur-sensitive pet-Mutanten bearbeitet worden. Aus den bisher erhaltenen und hier geschilderten Versuchen zur Kinetik der Inaktivierung mehrerer Funktionen in pleiotropen Mutanten konnten bisher allerdings noch keine eindeutigen Schlüsse auf die Inaktivierungs-Reihenfolge der einzelnen Funktionen abgeleitet werden. Zwar verschwand in allen Fällen die Cytochrom c Oxidase-Aktivität besonders rasch, die weitere Reihenfolge war jedoch, wenn überhaupt vorhanden, ohne erkennbares, etwa Komplementations-Gruppen-spezifisches, Prinzip. Künftige Versuche mit verbesserter zeitlicher und analytischer Auflösung des Inaktivierungsvorgangs könnten hierüber weitere Klarheit bringen.

Eine Reihe Kern-kodierter Atmungs-defekter Hefemutanten wurden auch in anderen Laboratorien isoliert und untersucht. Neben Mutanten, welche einen Ausfall in der Häm-Biosynthesekette enthalten und somit frei von jeglichen Cytochromen waren, handelte es sich, entsprechend den von uns isolierten Stämmen, einesteils um pleiotrop defekte wie auch um spezifisch Cytochrom c Oxidase- oder NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-defekte Stämme. In Übereinstimmung mit unseren Befunden traten auch dort keine spezifisch und ausschließlich ATPase-defekten Mutanten auf. Mit Hilfe dieser Mutanten konnten erste Hinweise auf die Bedeutung der Häm-Gruppe für die Biosynthese der einzelnen Apocytochrom-Untereinheiten (58) sowie für die Auswirkung einer bestimmten Kern-Mutation auf die Synthese von durch die Mutation nicht direkt betroffener, cytoplasmatisch (59) sowohl als auch mitochondriell (58) synthetisierter Proteine der Atmungskette gewonnen werden. So wurde z.B. gezeigt, daß eine nukleare Doppelmutation eines haploiden Saccharomyces cerevisiae-Stammes einen Ausfall der δ -Aminolävulinsäure-Synthese und damit einen fast totalen Verlust aller Cytochrome hervorrief. Gleichzeitig blieb aber die mitochondrielle ATPase-Aktivität erhalten (58). In einer anderen Saccharomyces cerevisiae- δ -Aminolävulinsäure-defekten Mutante führte ebenfalls die Abwesenheit von Häm und Häm-Vorstufen zum Verlust der Atmungsfähigkeit und zum Verschwinden aller Cytochrom-Banden (59). Weiterhin wurden vier Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase kaum noch, bzw. überhaupt nicht mehr synthetisiert. Die übrigen Untereinheiten wurden zwar synthetisiert, aber nicht mehr in den Komplex integriert (59). Die normale Synthese aller Cytochrome konnte in diesen Mutanten durch Zugabe von δ -Aminolävulinsäure zum Kultivations-Medium wiederhergestellt werden. Weiterhin sind mitochondrielle ts-Mutanten beschrieben worden, welche die Cytochrom aa₃-Bande und die

Cytochrom c Oxidase-Aktivität verloren hatten (60). Der Verlust der Enzymaktivität scheint auf einer in ihrem Molekular-Gewicht veränderten und vermutlich in den Komplex nicht mehr integrierten mitochondriell synthetisierten Untereinheit zu beruhen. Schließlich wurde in Neurospora crassa eine ts-Mutante nuklearen Ursprungs beschrieben, die zum Verlust der mitochondriell synthetisierten Untereinheit 1 führte. Während im Spektrum Cytochrom a nicht mehr nachweisbar war, war die Cytochrom b-Bande in normaler Intensität, die Cytochrom c-Bande in doppelter Intensität, verglichen mit Wildtyp-Hefe, vorhanden (61). Schon diese wenige Daten machen deutlich, daß die geordnete Synthese vieler Proteine der inneren Mitochondrien-Membran von einem komplexen Zusammenspiel mit anderen Komponenten dieser Membran abhängt.

Es wird das Ziel weiterer auf dieser Arbeit aufbauender Untersuchungen sein, mit Hilfe einer wesentlich größeren als der hier benutzten Anzahl von Mutanten diese Zusammenhänge systematisch weiter aufzuklären.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren Teil eines Projektes, das die biochemische Charakterisierung einer größeren Zahl von nuklearen, Atmungs-defizienten Saccharomyces cerevisiae Mutanten zum Ziel hatte. Dabei wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

1. Die Vertreter von 7 verschiedenen Komplementationsgruppen wiesen einen spezifischen Cytochrom c Oxidase-Defekt auf. Dieser Defekt prägte sich in den spektralen wie auch den enzymatischen Eigenschaften der Mutanten, in keinem der diesbezüglich untersuchten Fälle jedoch im immunologischen Verhalten des Zell-Rohextraktes gegenüber spezifischem Cytochrom c Oxidase-Antiserum aus.
2. Die Vertreter 1 Komplementationsgruppe waren im enzymatischen Test spezifisch NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-defekt. In Übereinstimmung damit nahm die Intensität der Cytochrom b-Bande bei 560 nm nach Wachstum bei 36°C deutlich ab. Ein völliger Ausfall der Cytochrom b-Absorption war auf Grund der Existenz mehrerer, funktionell verschiedener b-Typ Cytochrome in Mitochondrien auch nicht zu erwarten.
3. Es wurden keine spezifischen Cytochrom c-, Cytochrom c₁- oder ATPase-Mutanten gefunden.
4. Die Vertreter einer größeren Zahl von pet-Komplementationsgruppen wiesen pleiotrope, d.h. Mehrfach-Schäden auf: 8 Gruppen waren Cytochrom c Oxidase-, NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-defekt, 18 Gruppen waren Cytochrom c Oxidase-, NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-, ATPase-defekt, 6 Gruppen waren Cytochrom c Oxidase-, NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-, ATPase-defekt und noch zusätzlich rho-. Eine einzelne Mutante war Cytochrom c Oxidase-, ATPase-defekt.
5. Die Mutanten einer einzigen Komplementationsgruppe waren Atmungs-defizient, enthielten aber noch funktionsfähige Cytochrom c Oxidase-, NADH-Cytochrom c Oxidoreduktase-, und ATPase-Komplexe.
6. In Chemostat-Kulturen wurde der Inaktivierungs-Vorgang spezifischer wie pleiotroper pet-ts-Mutanten als Folge einer abrupten Erhöhung der Kultivations-temperatur auf 36°C zeitlich verfolgt. In allen Fällen war der Verlust der Atmungsfähigkeit zeitlich korreliert mit dem Verlust mindestens einer der untersuchten enzymatischen Funktionen. Bei pleiotrop defekten Mutanten wurde stets die Cytochrom c Oxidase-Aktivität am raschesten verloren. Die Inaktivierungsreihenfolge der übrigen Funktionen war unterschiedlich und eher Mutanten- als Komplementationsgruppen - spezifisch.

7. Es wurde eine Vorrichtung konstruiert, die es erlaubt, die zeitliche Zunahme der Zelldichte einer Kultur automatisch zu registrieren. Zusätzlich konnte mit Hilfe dieser Apparatur die Zelldichte einer Chemostat-Kultur auf jeden gewünschten Wert eingestellt und dort konstant gehalten werden. Auf diese Weise wurde die Temperatur-Abhängigkeit der Wachstumsraten verschiedener Temperatur-sensitiver Mutanten bestimmt. Es ergaben sich deutliche Erniedrigungen der Temperatur-Optima bei den Mutanten im Vergleich mit Wildtyp-Hefe.
8. Die Entwicklung einer Vorrichtung zur automatischen Entnahme und Auswertung von Proben aus Chemostat-Kultur nach beliebig vorwählbaren Zeitplan sowie die Entwicklung einer Apparatur zur kontinuierlichen Temperaturerhöhung des Mediums in einer Chemostat-Kultur wurde dargestellt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lehninger, A.L.: Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Structure and Function, Worth Publishers Inc., New York (1975)
2. Metzler, D.E. Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells, Academic Press, New York, London (1977)
3. Mitchell, P.: Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism, Nature, 191 (1961)
4. Mitchell, P.: Vectorial Chemiosmotic Processes, Annual Rev. Biochem., 46 (1977) 976-1005
5. De Pierre, J.W.: Ernster, L.: Enzyme Topology of Intracellular Membranes, Ann. Rev. Biochem., 46 (1977) 201-262
6. Baugh, R.F.; King, T.S.: Purification, Properties and Reconstitutive Activities of a DPNH Dehydrogenase, Biochem. Biophys. Res. Commun., 49 (1972) 1156
7. Ragan, C.I.: The Structure and Subunit Composition of the Particulate NADH-Ubiquinone Reductase of Bovine Heart Mitochondria, Biochemical Journal, 154 (1976) 295-305
8. Hatefi, Y.; Rieske, J.S.: Preparation and Properties of DPNH-Coenzyme Q Reductase (Complex I) of the Respiratory Chain, Meth. Enzymol. 10 (1967) 235-239
9. Harmon, H.J.; Crane, F.L.: Inhibition of Mitochondrial Electron Transport by Hydrophilic Metal Chelators, Determination of Dehydrogenase Topology, Biochem. Biophys. Acta 440 (1976) 45-48
10. Hatefi, Y.; Stigall, D.L.: Metal-Containing Flavoprotein Dehydrogenases, The Enzymes, 13 (1976) 175-197
11. Onishi, T.; Salerno, J.C.; Winter, D.B.; Lim, Y.; Yu, C.A.; Yu, L.; King, T.E.: Thermodynamic and EPR Characteristics of two Ferredoxin type Iron Sulfur Centers in the Succinate Ubiquinone Reductase Segment of the Respiratory Chain, J. Biol. Chem., 251 (1976) 2094
12. Ziegler, D.; Rieske, J.S.: Preparation and Properties of Succinate Dehydrogenase Coenzyme Q Reductase (Complex II), Meth. Enzymol. 10 (1967) 231-235

13. Ernster, L.; Lee, I.-Y.; Norling, B.; Persson, B.: Studies with Ubiquinol depleted Submitochondrial Particals, Eur. J. Biochem., 9 (1969) 299-310
14. Gutman, M.; Kearney, E.B.; Singer, T.P.: Control of Succinate Dehydrogenase in Mitochondria, Biochemistry 10 (1971) 4763-4770
15. Rieske, J.S.: Preparation and Properties of Reduced Coenzyme Q Cyt c-Reductase (Complex III of the Respiratory Chain), Meth. Enzymol. 10 (1967) 239-245
16. Baum, H.; Rieske, J.S.; Silman, H.J.; Lipton, S.H.: On the Mechanism of Electron Transfer in Complex III of the Electron Transfer Chain, Proc. Natl. Sci. USA, 57 (1967) 798-805
17. Nishibayashi-Yamashita, H.; Cunningham, C.; Racker E.: Resolution and Reconstitution of the Mitochondrial Electron Transport Chain III. Order of Reconstitution and Requirement for a New Factor for Respiration, J. Biol. Chem. 247 (1972) 698-704
18. Ross, E.; Schatz, G.: Cytochrome c₁ of Bakers' Yeast. I. Isolation and Properties, J. Biol. Chem. 251 (1976) 1991-1996
19. Wharton, D.C.; Tzagoloff, A.: Cytochrome c Oxidase from Beef Heart Mitochondria, Meth. Enzymol., 10 (1967) 245-251
20. Rubin, M.S.; Tzagoloff, A.: Assembly of the Mitochondrial Membrane Systeme IX. Purification, Characterisation and Subunit Structure of Yeast and Beef Cytochrome Oxidase, J. Biol. Chem., 248 (1973) 4269-4274
21. Mason, T.L.; Poyton, R.O.; Wharton, D.C.; Schatz, G.: Cytochrome c Oxidase from Bakers' Yeast. Isolation and Properties, J. Biol. Chem. 248 (1973) 1346-1354
22. Shakespeare, P.G.; Mahler, H.R.: Purification of Cytochrome c Oxidase from the Yeast Saccharomyces cerevisiae, J. Biol. Chem. 246 (1971) 7649-7655
23. Poyton, R.O.; Schatz, G.: Cytochrome c Oxidase from Bakers' Yeast: Physical Characterisation of Isolated Subunits and Chemical Evidence for Two Different Classes of Polypeptides, J. Biol. Chem., 250 (1975) 752-761
24. Eytan, G.D.; Schatz, G.: Cytochrome c Oxidase from Bakers' Yeast: Arrangement of the Subunits in the Isolated and Membrane Bound Enzyme, J. Biol. Chem. 250 (1975) 767-774

25. Senior, A.E.: The Structure of Mitochondrial ATPase, Biochim. Biophys. Acta, 301 (1973) 249-277
26. Knowles, A.F.; Penefsky, H.S.: The Subunit Structure of Beef Heart Mitochondrial Adenosine Triphosphatase, J. Biol. Chem., 247 (1972) 6624-6630
27. Serano, R.; Kanner, B.I.; Racker, E.: Purification and Properties of the Proton-Translocating Adenosine Triphosphatase Complex of Bovine Heart Mitochondria, J. Biol. Chem., 251 (1976) 2453-2461
28. Pullman, M.E.; Monroy, G.C.: A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase, J. Biol. Chem., 238 (1963) 3762-3769
29. Tzagoloff, A.; Meagher, P.: Assembly of the Mitochondrial Membrane System. Properties of a Dispersed Preparation of the Rutamycin-Sensitive Adenosine Triphosphatase of Yeast Mitochondria, J. Biol. Chem., 246 (1971) 7328-7336
30. Tzagoloff, A.: Assembly of the Mitochondrial Membrane System. Role of Mitochondrial and Cytoplasmic Protein Synthesis in the Biosynthesis of Rutamycin-Sensitive Adenosine Triphosphatase, J. Biol. Chem., 246 (1971) 3050-3056
31. Mc Lennan, D.H.; Tzagoloff, A.: Studies on the Mitochondrial Adenosine Triphosphatase System. IV. Purification and Characterisation of the Oligomycin Sensitivity Conferring Protein, Biochemistry, 7 (1968), 1603-1610
32. Ephrussi, B.; Slonimski, P.P.: La Synthèse Adaptative des Cytochromes chez la Levure de Boulangerie, Biochim. Biophys. Acta, 6 (1950) 256-267
33. Rouslin, W.: Oxygen Dependence of Promitochondrial and Cytoplasmic Protein Synthesis in the Formation of Electron Transfer Complexes III and IV in Adapting Baker' Yeast, Arch. Biochem. Biochem. Biophys., 168 (1975) 685-692
34. Maccacchini, M.-L.; Rudin, Y.; Blobel, G.; Schatz, G.: Import of Proteins into Mitochondria: Precursor Form of the Extramitochondrially Made F₁-ATPase Subunits in Yeast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (1979) 343-347
35. Borst, P.: Mitochondrial Nucleic Acids, Annual Rev. Biochem., 41 (1972) 332-376

36. Schatz, G.; Mason, T.L.: The Biosynthesis of Mitochondrial Proteins, Annual Rev. Biochem., **43** (1974) 51-87
37. Rubin, M.S.; Tzagoloff, A.: Assembly of the Mitochondrial Membrane System, X. Mitochondrial Synthesis of Three of the Subunit Proteins of Yeast Cytochrome Oxidase, J. Biol. Chem., **248** (1973) 4269-42
38. Lin, L.-F. H.; Clejan, L.; Beattie, D.S.: The Synthesis of Cytochrome_b on Mitochondrial Ribosomes in Baker's Yeast, Eur. J. Biochem., **87** (1978) 171-179
39. Tzagoloff, A.; Needleman, R.B.; Zulch, G.: Assembly of the Mitochondrial Membrane System. Cytoplasmic Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with Lesions in Enzymes of the Respiratory Chain and in Mitochondrial ATPase, J. Biol. Chem., **250** (1975) 8236-8242
40. Sherman, F.; Stuart, I.W.; Margolish, E.; Parker, J.; Campell, W.: The Structural Gene for Yeast Cytochrome c, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **55** (1966) 1489-1504
41. Schatz, G.: The Biogenesis of Mitochondria - a Review. In: Genetics and Bioenergetics of Mitochondria, Proceedings of a Symposium held at the Genet. Inst. der Univ. München (eds.: Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Thomas, D.Y.; Wolf, K.; Kaude-witz, F.), Walter de Gruyter, Berlin-New York (1975)
42. Sigimura, T.; Okabe, K.; Nagao, M.; Gunge, M.: A Respiratory Deficient Mutant of *Saccharomyces cerevisiae* which Accumulates Porphyrins and lacks Cytochromes, Biochem. Biophys. Acta, **115** (1966) 267-275
43. Sanders, H.K.; Mied, P.A.; Briquet, M.; Hernandez-Rodrigues, J.; Gattal, R.F.; Mattoon, J.R.: Regulation of Mitochondrial Biogenesis: Yeast Mutants Deficient in Synthesis of δ -amino-laevulinic Acid. J. Mol. Biol., **80** (1973) 17-39
44. Demmer, W.: Genetische Charakterisierung von Atmungsdefizienten *Saccharomyces cerevisiae*-Mutanten, Diplomarbeit Würzburg 1975
45. Needleman, R.B.; Tzagoloff, A.: Breakage of Yeast, A Method for Processing Multiple Samples, Anal. Biochem., **64** (1975) 545-549
46. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Rand, R.J.: Protein Meseasurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem., **193** (1951) 265-275

47. Mason, T.L.; Poyton, R.O.; Wharton, D.C.; Schatz, G.: Cytochrom c Oxidase from Bakers Yeast, I. Isolation and Properties, J. Biol. Chem., 248 (1973) 1346-1354
48. Laemmli, U.K.: Cleavage of Structural Proteine during the Assembly of the Head of Bacteriophage T₄, Nature, 227 (1970) 680
49. Ouchterlony, Ö.: Arkiv Kemi 26B (1949) 1-9
50. Tzagoloff, A.; Akai, A.; Needleman, R.B.: Assembly of the Mitochondrial Membrane System, Characterisation of Nuclear Mutants of Saccharomyces cerevisiae with Defects in Mitochondrial ATPase and Respiratory Enzymes, J. Biol. Chem., 250 (1975) 8228-8235
51. Keilin, D.; Hartree, E.F.: Effects of Low Temperature on the Absorption Spectra of Haemoproteins; With Observations on the Absorption Spectrum of Oxygen, Nature, 164 (1949) 254-259
52. Holzner, U.: Dissertation Erlangen 1978
53. Schweizer, E.; Demmer, W.; Holzner, U.; Tahedl, H.-W.: Controlled Mitochondrial Inactivation of Temperature-Sensitive Saccharomyces cerevisiae Nuclear Petite Mutants, in: Genetics and Biogenesis of Mitochondria, Bandlow, W.; Schweyen, R.J.; Wolf, K.; Kaudewitz, F. eds.: Walter de Gruyter Berlin New York 1977
54. Rubin, M.S.; Tzagoloff, A.: Cytochrome Oxidase of Saccharomyces cerevisiae, Meth. Enzymol. Vol. LIII Part D (1978) 73-79
55. Knobling, A.; Schweizer, E.: Temperature-Sensitive Mutants of the Yeast Fatty Acid Synthetase Complex, Eur. J. Biochem., 59 (1975) 415-421
56. Tzagoloff, A.; Maciano, G.; Sebald, W.: Mitochondrial Genes and Translation Products, Ann. Rev. Biochem., 48 (1979) 419-441
57. Ebner, E.; Mason, T.L.; Schatz, G.: Mitochondrial Assembly in Respiratory Deficient Mutants of Saccharomyces cerevisiae: II. Effect of Nuclear and Extrachromosomal Mutations on the Formation of Cytochrom c Oxidase, J. Biol. Chem., 248 (1973) 5369-5378
58. Saltzgaber-Müller, J.; Schatz, G.: Heme is Necessary for the Accumulation and Assembly of Cytochrom c Oxidase Subunits in Saccharomyces cerevisiae, J. Biol. Chem., 253 (1978) 305-310

59. Sanders, H.K.; Briquet, M.; Foury, F.; Drysdale, B.-E.; Mattoon, J.R.: Regulation of Mitochondrial Biogenesis: Enzymatic Changes in Cytochrome-deficient Yeast Mutante Requiring δ -Aminolevulinic Acid, J. Biol. Chem., 250 (1975) 9090-9098
60. Ecclesham, T.R.; Needleman, R.B.; Strom, E.M.; Buchferer, B.; Marmur, J.: A Temperature Sensitive Yeast Mitochondrial Mutant with Altered Cytochrom c Oxidase Subunit, Nature, 273 (1978) 67-70
61. Norgang, F.E.; Bertrand, H.; Werner, S.: A Nuclear Mutant of *Neurospora crassa* Lacking Subunit 1 of Cytochrome c Oxidase, J. Biol. Chem., 253 (1978) 6364-6369

LEBENS LAUF

Vor- und Familienname:	Wolfgang Alois Demmer
Geburtsort und -tag:	Bad Kissingen, 21. August 1949
Vater:	Alois Demmer, Bauingenieur
Mutter:	Annemarie Demmer, geb. Kutzbach
Ehefrau:	Ursula Demmer, geb. Regner, Kinder- gärtnerin
Schulbildung:	
1955 - 1959	Volksschule in Bad Kissingen
1959 - 1969	Neusprachliches Gymnasium in Bad Kissingen
	Reifezeugnis vom 28. Juni 1969
Studium:	
WS 1969/70 - SS 1976	Studium der Biologie an der Univer- sität Würzburg
April 1972	Diplom-Vorprüfung für Biologen
August 1974	Diplom-Hauptprüfung für Biologen mit dem Hauptfach Biochemie
	Fächer: Biochemie, Pflanzenphysiolo- gie, Mikrobiologie, Geologie
Oktober 1974 - Juli 1975	Diplomarbeit am Institut für Bioche- mie in Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Schweizer
September 1975 - September 1979	Doktorarbeit am Institut für Bio- chemie der Universität Erlangen- Nürnberg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Schweizer
Angestelltenverhältnis:	
September 1975 - August 1978	Inhaber einer BAT IIa/2 Stelle an der Universität Erlangen-Nürnberg
September 1978 - Dezember 1979	Verwalter einer halben Assistenten- stelle an der Universität Erlangen- Nürnberg

Druck: Höfer & Limmert, Erlangen